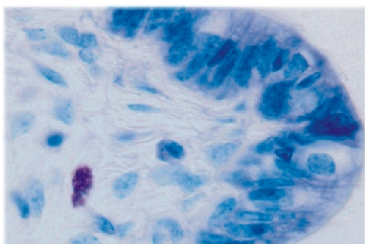
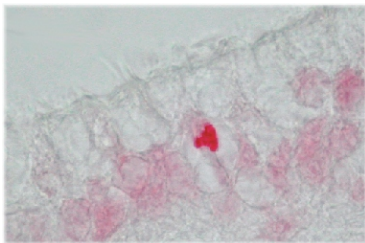
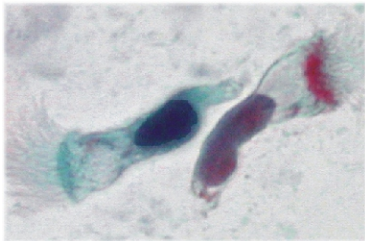


Untersuchungen zur zyklusabhängigen funktionellen Morphologie der equinen Zervix



JASMIN WALTER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYKLUSABHÄNGIGEN
FUNKTIONELLEN MORPHOLOGIE
DER EQUINEN ZERVIX**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

JASMIN WALTER

Tierärztin aus Wolfach
(Baden-Württemberg)

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend

Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

Tag der Disputation: 19. Juni 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	2
2.1	Makroskopische Anatomie der Zervix bei der Stute	2
2.2	Ontogenese der Zervix	2
2.3	Mikroskopische Anatomie der Zervix bei der Stute	3
2.4	Hormonelle Veränderungen während des Zyklus der Stute	5
2.5	Zyklusansprache bei der Stute	10
2.6	Zyklusabhängige morphologische Veränderungen der Zervix	13
2.7	Endokrinologische Steuerung der morphologischen Veränderungen der Zervix	16
2.8	Diagnostische Verfahren zur Beurteilung der Zervix	22
2.9	Exfoliative Zytologie der Genitalorgane der Stute	28
3	Material und Methode	37
3.1	Probanden	37
3.2	Hämatologische Untersuchung	38
3.3	Endokrinologische Untersuchung	38
3.4	Zuordnung der Stuten in die Zyklusstadien	39
3.5	Materialgewinnung	42
3.6	Exfoliative Zytologien	43
3.7	Aufarbeitung der Gewebeproben	45
3.8	Färbung der Gewebeschnitte	47

3.9	Lichtmikroskopische Auswertung der exfoliativen Zytologien	51
3.10	Lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte	51
3.11	Statistische Methoden	52
4	Ergebnisse	54
4.1	Zyklusdiagnostik	54
4.2	Ergebnisse der exfoliativen Zervikalzytologien	56
4.3	Ergebnisse der exfoliativen Endometriumszytologien	62
4.4	Korrelation der Ergebnisse zwischen den exfoliativen Zervikal- und Endometriumszytologien	64
4.5	Allgemeine histologische Beschreibung	67
4.6	Eosinophile Granulozyten	69
4.6.1	Vagina	70
4.6.2	Zervix	72
4.6.3	Uterus	80
4.6.4	Korrelation der Dichte eosinophiler Granulozyten in den Genitalorganen	82
4.7	Mastzellen	84
4.7.1	Vagina	85
4.7.2	Zervix	86
4.7.3	Uterus	94
4.7.4	Korrelation der Mastzellen-Dichte in den Genitalorganen	95
4.8	Korrelation zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den Genitalorganen	97

5	Diskussion	99
5.1	Diskussion der Fragestellung	99
5.2	Diskussion der Methodik	99
5.3	Zyklusdiagnostik	104
5.4	Exfoliative Zytologien	105
5.5	Histologische Untersuchungen	109
5.5.1	Eosinophile Granulozyten und Mastzellen in den Kontrollorganen	109
5.5.2	Eosinophile Granulozyten in den Geschlechtsorganen	109
5.5.3	Mastzellen in den Geschlechtsorganen	115
5.6	Schlussbetrachtung	122
6	Zusammenfassung	123
7	Summary	126
8	Anhang	129
8.1	Geräte	129
8.2	Materialien	129
8.3	Lösungen	129
9	Literaturverzeichnis	132

1 Einleitung

Die Zervix besitzt aufgrund ihrer Lage zwischen dem Uterus und der Vagina mit deren offener Verbindung zur Aussenwelt eine Schutzfunktion für das *Cavum uteri*. Dabei muss der Verschlussmechanismus zu bestimmten Phasen des Reproduktionszyklus aufgehoben werden, um eine Drainage des Uterus, die Bedeckung oder Besamung und die Austreibung des Neonaten zu gewährleisten.

Über die zugrundeliegenden Steuerungsmechanismen der Zervixöffnung in der Rosse ist wenig bekannt. Die Aufhebung des zervikalen Schlusses wird mit steigenden Östrogen- und fallenden Progesteronkonzentrationen in Verbindung gebracht, doch sind die damit assoziierten Veränderungen in der Gewebsarchitektur bisher nicht untersucht worden.

Ziel dieser Studie war es, zyklusabhängige Veränderungen des zervikalen Gewebes bei der Stute zu charakterisieren. Dabei war Schwerpunkt, die These zu überprüfen, dass hormonabhängige, regionale Unterschiede in der Gewebsinfiltration mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen entlang des *Canalis cervicalis* bestehen. Weiterhin sollten Grundlagen gelegt werden, um die exfoliative Zervikalzytologie als diagnostisches Verfahren zur Ergänzung der Endometriumszytologie bei der Stute zu etablieren.

2 Literatur

2.1 Makroskopische Anatomie der Zervix bei der Stute

Die Zervix mit ihrer Lage zwischen Vagina und Uteruskörper ist ein dickwandiges Organ mit einer Länge von 5,0 bis 7,5 cm und einem Durchmesser von 3,5 bis 4 cm (Sisson, 1975). Ihre Konsistenz ist relativ derb, worauf ihre gute rektale Palpierbarkeit beruht. Sie bildet den *Canalis cervicalis*, der mit dem trichterförmigen *Ostium uteri internum* in den Uterus mündet. Das *Ostium uteri externum* stülpt sich mit der *Portio vaginalis* in das Scheidenlumen vor. Während des Östrus sinkt der Gewebstonus aufgrund der Ödematisierung des Gewebes. Die sonst zentral zapfenförmig vorstehende *Portio vaginalis cervicis* liegt am Boden des *Cavum vaginae*.

Die Zervix des Pferdes besitzt keine, wie bei anderen Tierarten vorhandenen, zusätzlichen Verschlussvorrichtungen. Im Inneren des Zervikalkanales befindet sich eine in Längsfalten (*Plicae longitudinales*) gelegte Schleimhaut. Die *Plicae longitudinales* erreichen in der Mitte der Zervix ihre maximale Höhe und setzen sich auf der *Portio vaginalis cervicis* fort, weshalb diese radiär gestreift erscheint (Röber, 1914). Eine Falte kann sich als *Frenulum* bis auf den Boden der Vagina fortsetzen (Kainer, 1992). Nach cranial ziehen die Falten trichterförmig in das *Corpus uteri* weiter, wo sie sich allmählich verlieren (Leiser, 1999).

Das Mesometrium bildet die Aufhängung der Zervix in der Beckenhöhle. Während der Gravidität verlagert sie sich aufgrund des Gewichtes der Frucht und dem daraus resultierenden Zug in die Bauchhöhle.

2.2 Ontogenese der Zervix

Der Genitalkanal der weiblichen Tiere differenziert sich aus den *Ducti paramesonephrici*, den sogenannten Müllerschen Gängen. Bei beiden Geschlechtern sind zunächst sowohl die *Ducti mesonephrici*, die sogenannten Wolffschen Gänge, als auch die *Ducti paramesonephrici* angelegt. Die weitere Entwicklung ist durch die Geschlechtschromosomen, speziell das männliche Y-Chromosom, festgelegt. Die Expression des SRY-Gens auf dem Y-Chromosom (*sex determining region of the Y*

chromosome), eines Transkriptionsfaktors, induziert die Entwicklung des fetalen Hodens (Patel et al., 2001). Beim Fehlen des SRY-Gens entwickeln sich die Ovarien (Kuiper und Distl, 2004).

Aus den paarig angelegten Müllerschen Gängen entstehen in der cranialen Region die Eileiter, im caudalen Bereich verschmelzen die beiden Gänge zum Uterovaginalkanal. Beim Pferd vereinigen sich die Gänge bis zum *Corpus uteri*, während sie im vorderen Teil getrennt bleiben. Es entwickelt sich ein *Uterus bicornis* (Schnorr und Kressin, 2001). Eine *Cervix duplex* bei der Stute, wie von Wehrend et al. (2001) beschrieben, kann infolge einer Hemmungsmissbildung in Form einer Fusionsanomalie der Müllerschen Gänge entstehen. Yin und Ma (2005) beschrieben eine Reihe an Genen, die an der Entwicklung des weiblichen Reproduktionstraktes beteiligt sind und die phänotypischen Veränderungen der entsprechenden Knock-Out Mäuse. So führt beispielsweise das Fehlen des Genes *Wnt5a* zu einem verkürzten Uterus und einer verminderten Ausbildung von Zervix und Vagina.

2.3 Mikroskopische Anatomie der Zervix bei der Stute

Die Zervix ist ein Organ, das vor allem aus glatter Muskulatur und Bindegewebe besteht (Schuh, 1993). Der histologische Aufbau weist von innen nach aussen die folgenden drei Schichten auf: *Tunica mucosa*, *Tunica muscularis* sowie die *Tunica serosa*.

Tunica mucosa

Die Schleimhaut besteht aus zwei Schichten, dem Epithel sowie der *Lamina propria mucosae*. Das meist einschichtige hochprismatische Oberflächenepithel grenzt die *Tunica mucosa* zum Lumen des Zervikalkanals hin ab. Die Schleimhaut ist in Primärfalten gelegt, die sich wiederum in Sekundär- und Tertiärfalten aufzweigen. Das Oberflächenepithel nimmt auf Höhe der Faltenkämme selten auch mehrstufige Formen an, wohingegen eine Mehrreihigkeit nie erkannt wird (Huchzermeyer, 2003). Laut Huchzermeyer (2003) beträgt die durchschnittliche Höhe des Epithels $17,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$, wobei die Epithelhöhe auf den Faltenkämmen mit $19,0 \pm 2,4 \mu\text{m}$ deutlich über denen der Faltentäler ($15,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$) liegt. Desweiteren verlieren die Zellen von cranial nach caudal an Höhe. Das Epithel setzt sich aus Becherzellen, vereinzelt

Flimmerzellen und vor allem aus muzigenen Zellen zusammen (Leiser, 1990). Bei den Flimmerzellen finden sich deutlich sichtbare Kinozilien an der apikalen Membran. Sie zeichnen sich durch ein blasses Zytoplasma sowie einen Zellkern, der im mittleren Drittel der Zelle liegt, aus. Die Flimmerzellen wechseln sich mit Becherzellen ab, die Schleim enthalten, der sich mittels der Perjodsäure-Schiffs-Reaktion nachweisen lässt. Die Becherzellen sind schmal, das Zytoplasma ist dunkel und der Zellkern liegt basalwärts. Gelegentlich finden sich kleine, pyramidenförmige bis rundliche Zellen an der Basalmembran, die das Lumen der Zervix nicht erreichen (Huchzermeyer et al., 2005). Die muzigenen Zellen produzieren den zähflüssigen Zervikalschleim, der in der Gravidität als Pfropf den äusseren Muttermund völlig verschliesst. Laut Smollich (1992) kommen Zervikaldrüsen nur beim Fleischfresser vor. Leiser (1990) beschrieb sie nur bei Schweinen, kleinen Wiederkäuern sowie beim Menschen, beim Pferd wurden keine erwähnt.

Die *Lamina propria mucosae* zeichnet sich durch ein lockeres, proliferationsaktives Bindegewebe mit einem hohen Gehalt an kollagenen und elastischen Fasern aus. Schon 1910 beschrieb Röber die zahlreichen elastischen Fasern unter der Zervikalschleimhaut, die wenig geschlängelt die Richtung der Organachse einhalten. Die Fasern liegen in Bündeln, die scherengitterartig angeordnet sind und die Grundlage der Falten bilden. Diese Fasern verzweigen sich und schieben sich in die angrenzende Muskelschicht (Liebich, 2004). Sowohl bei der Stute als auch bei der Hündin liegt in der Tiefe ein longitudinal verlaufendes Venengeflecht (Schmalz, 1911; Röber, 1914; Friedkalns und Leiser, 1999; Huchzermeyer, 2003). In der *Lamina propria mucosae* lassen sich sowohl leicht myelinisierte als auch nichtmyelinisierte Nervenfasern nachweisen (Priedkalns und Leiser, 1999).

Tunica muscularis

Die *Tunica muscularis* besteht aus glatter Muskulatur, die sich in zwei Schichten differenziert, einer inneren mehr zirkulären Schicht sowie einer äusseren vermehrt longitudinalen Schicht. Die Muskulatur ist von zahlreichen elastischen Fasern durchzogen. Diese Muskelschichten bilden die Grundlage der *Portio vaginalis cervicis*. Die beiden Schichten kommunizieren mit den entsprechenden Schichten aus Uterus und Vagina (Leiser, 1990). Nach Schuh (1993) macht der bindegewebige Anteil der Zervix 68,66 % aus, der Anteil glatter Muskulatur liegt bei 31,34 %.

Tunica serosa

Zur Bauchhöhle wird die Zervix von der *Tunica serosa*, einem einschichtigen Plattenepithel überzogen. Darunter liegt die bindegewebige *Tela subserosa*, aus der Fasern in die *Tunica muscularis* ziehen. Die beim weiblichen Tier zurückgebildeten Wolffschen Gänge können als einseitig oder beidseitig verlaufender *Ductus epoophori longitudinalis* (Gartnerscher Gang) in der Serosa liegen (Priedkalns und Leiser, 1999; Schnorr und Kressin, 2001).

2.4 Hormonelle Veränderungen während des Zyklus der Stute

Im Frühjahr geborene Stuten erreichen mit einem Alter von 291 bis 408 Tagen die Geschlechtsreife (Brown-Douglas et al., 2004). Bereits präpuberal kommt es zu Follikelanbildungswellen, aus denen sich jedoch kein dominanter Follikel entwickelt. Als saisonal polyöstrische Tiere zählen Pferde zu den Long-Day-Breedern. So sind Stuten in der nördlichen Hemisphäre von April bis November und Stuten in der südlichen Hemisphäre von Oktober bis Mai zyklisch aktiv (Davies Morel, 2003). Der Sexualzyklus weist eine mittlere Länge von 21 bis 22 Tagen auf. Klinisch lässt sich der Zyklus in zwei Phasen einteilen, den Östrus oder die Follikelphase und den Diöstrus oder die Lutealphase (Hopkins und Althouse, 2003). Die mittlere Länge des Östrus liegt bei 6,5 Tagen, die des Diöstrus bei 14,9 Tagen (LeBlanc et al., 2003). Die Ovulation erfolgt 24 bis 48 Stunden vor Ende der Rosse (Daels und Hughes, 1992). Der Tag der Ovulation entspricht definitionsgemäss dem Tag 0 des Zyklus.

Die endokrine Regulation des Sexualzyklus erfolgt durch die Gonadotropine und deren Releasinghormon aus dem Zentralnervensystem sowie durch die Hormone der Gonaden, die rückkoppelnd direkt oder indirekt auf die Ausschüttung der Gonadotropine wirken.

Die Saisonalität wird durch das Hormon Melatonin aus den Pinealzellen der Epiphyse gesteuert. In der Dunkelheit wird mehr Melatonin freigesetzt als unter konstantem Lichteinfluss (Diekman et al., 2002). Aber auch bei Stuten, die ständiger Dunkelheit ausgesetzt sind, fluktuiert der Melatoninspiegel, so dass das Licht nicht der einzige einflussnehmende Faktor auf die Epiphyse zu sein scheint (Aurich und Klug, 1993).

Weitere exogene Faktoren wie Klima, Fütterung und Haltung nehmen zusätzlich Einfluss auf die Saisonalität des Zyklus der Stute. Beim Pferd kommt es infolge erhöhter Melatoninkonzentrationen bei kurzer Tageslichtdauer zur Hemmung der Sekretion des Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) (Meinecke, 2000).

GnRH nimmt eine zentrale Stellung in den verschiedenen Regelkreisen des Zyklusgeschehens ein (Abbildung 1). Es handelt sich um ein Dekapeptid, das in den neurosekretorischen Zellen des Hypothalamus gebildet wird.

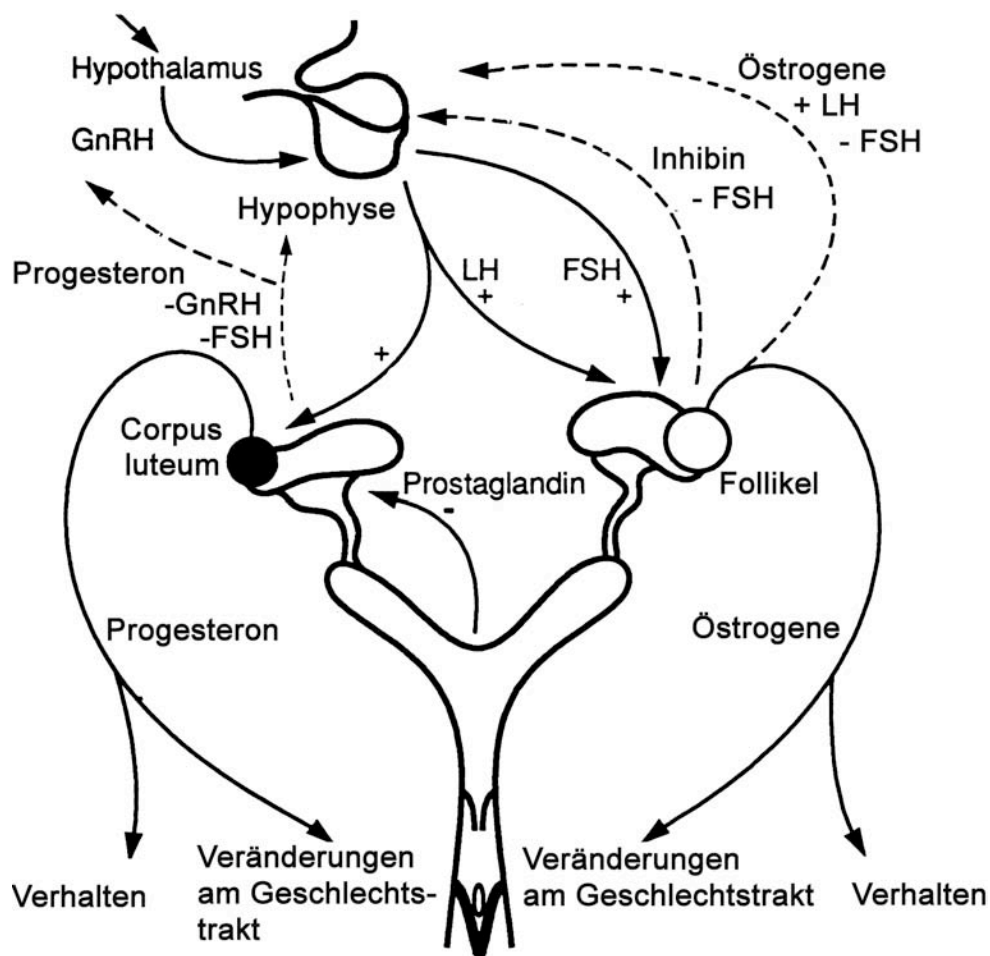


Abbildung 1: Schematische Darstellung der hormonellen Regulation des Sexualzyklus der Stute, modifiziert nach Rossdale und Ricketts (1980).

Im *Nucleus arcuatus* des Hypothalamus sitzt der sogenannte Pulsgenerator, der die basale GnRH-Freisetzung reguliert. Er steht unter dem Einfluss verschiedener Transmitter und Neuromodulatoren (Handler und Aurich, 2005).

GnRH bewirkt an der Hypophyse zum einen die Freisetzung von follikelstimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH), zum anderen erhöht es die Anzahl seiner eigenen Rezeptoren an den gonadotropen Zellen. So kommt es nach dem zweiten GnRH-Impuls zu einer deutlich höheren LH-Ausschüttung als nach dem ersten (Aiyer et al., 1974). Dies ist im Rahmen der medikamentellen Ovulationsinduktion von Bedeutung, da eine einmalige Injektion von GnRH-Präparaten meist nicht ausreicht (Jöchle, 1995; Barrier-Battut et al., 2001; Lack und Huchzermeyer, 2004).

Die beiden Gonadotropine LH und FSH sind Glykoproteine, die im Hypophysenvorderlappen gebildet werden.

FSH fördert das Follikelwachstum und die Follikelvaskularisierung. Über die Aktivierung der 17 β -Aromatase wird die Östradiol-17 β -Synthese der Follikel angeregt. Ausserdem führt FSH zur verstärkten Expression von LH-Rezeptoren in den Granulosazellen. Während des Zyklus der Stute zeigt FSH einen biphasischen Konzentrationsverlauf. Dieser entspricht den Haupt- und Nebenwellen der Follikelanbildung (Abbildung 2). Die erste Welle beginnt direkt nach der Ovulation, es entwickelt sich ein dominanter Follikel, der jedoch meist atresiert. Atresiert er nicht kommt es zu den vereinzelt auftretenden Diöstrus-Ovulationen (Rödiger und Bostedt, 2004). Die zweite Welle beginnt im späten Diöstrus und der daraus hervorgehende dominante Follikel gelangt in der Rosse zur Ovulation (Ginther, 2000). Der Gipfel der FSH-Konzentration tritt auf, wenn der dominante Follikel einen Durchmesser von 1,3 cm aufweist, danach nimmt die FSH-Konzentration ab (Gastal et al., 1997). Dieser FSH-Abfall ist für die Ausbildung eines einzelnen dominanten Follikels verantwortlich. Durch Applikation von FSH in diesem Zeitraum kommt es zur Anbildung mehrerer dominanter Follikel (Ginther et al., 2005).

Die endokrine Steuerung der Follikelreifung wird über die FSH-Rezeptoren in den Granulosazellen und die LH-Rezeptoren in den Zellen der Theca-interna vermittelt. Die zunächst limitierte Zahl der FSH-Rezeptoren steigt unter dem mitogenen Einfluss der Östrogene, welche die Zunahme der Granulosazellen bewirken und so indirekt die FSH-Rezeptoren ansteigen lassen.

Östrogene werden neben Inhibin als FSH-Suppressoren diskutiert (Ginther, 2000; Ginther et al., 2005). Durch diese beiden Hormone regressieren die kleineren Follikel. Die Applikation von Anti-Inhibin bewirkt die Ausbildung mehrerer dominanter

Follikel (Ginther et al., 2005). Die höchste Plasma-Inhibinkonzentration tritt während der Ovulation auf (Bergfelt et al., 1991; Nambo et al., 2002).

LH ist das Hormon, welches für die Follikelreifung und die Ovulation essentiell ist. Die LH-Konzentration im Plasma verläuft gegenläufig zu der des FSH. Der periovulatorische LH-Anstieg beginnt mit dem FSH-Abfall (Abbildung 2). Beim Pferd findet sich im Gegensatz zu anderen Tierarten kein präovulatorischer LH-Peak sondern ein LH-Plateau, das etwa eine Woche lang anhält und gegen Ende der Rosse die Ovulation auslöst. Maximale LH-Werte werden am Tag nach der Ovulation erreicht, anschliessend nimmt die Konzentration wieder ab (Ginther et al., 2005). Diese hohen postovulatorischen LH-Werte werden für die bei Stuten relativ häufig vorkommenden Doppelovulationen verantwortlich gemacht (Daels und Hughes, 1992). Durch den hohen Sialinsäuregehalt des equinen LH koppelt dieses schlechter an die Galactose-Rezeptoren in der Leber, weshalb es eine lange Halbwertszeit im Blut von fünf Stunden besitzt (Alexander und Irvine, 1992). LH bewirkt nach der Ovulation die Anbildung des *Corpus luteum* sowie die Umstellung der Granulosazellen von der Östrogen- auf die Progesteronproduktion.

Mit zunehmendem Follikelwachstum vergrössert sich die *Theca interna* des Follikels, was mit einer Steigerung der Produktion von Androgenen einhergeht. In den Granulosazellen werden die Androgene durch das unter FSH-Einfluss aktivierte Enzym Aromatase-17 β zu Östradiol-17 β , dem wichtigsten Östrogen des Pferdes, aromatisiert (Handler und Aurich, 2005). Die Östrogene führen am Follikel zu einer vermehrten Gefässeinsprossung in die *Theca interna*. Durch die bessere Blutversorgung verfügt der östrogenreichste dominante Follikel über höherer FSH-Konzentrationen als die untergeordneten Follikel und kann somit wieder verstärkt Östrogene synthetisieren. Die Östrogenkonzentrationen beginnen 6 bis 8 Tage vor der Ovulation anzusteigen (Ginther, 1992 c). Das Maximum der Östrogenkonzentration im Blutplasma liegt etwa zwei Tage *ante ovulationem* (Daels et al., 1991; Meyer-Scheel, 2005). Hier werden Werte von 10 bis 15 pg/ml erreicht (Davies Morel, 2003). Während der Ovulation sinkt die Konzentration und erreicht 1 bis 2 Tage *post ovulationem* diöstrische Werte (Ginther, 1992 c).

Die luteinisierten Granulosazellen produzieren Gestagene, wobei das wichtigste Gestagen bei ingraviden Stuten das Progesteron ist. Bei Stuten ohne aktives Lutealgewebe liegt die Konzentration von Progesteron im Plasma unter 1 ng/ml.

Schon während der Ovulation steigt die Progesteronkonzentration leicht an (Meyer-Scheel, 2005). Der erste signifikante Anstieg der Progesteronkonzentration bei der Stute liegt 12 bis 24 Stunden *post ovulationem* (Ginther, 1992 c). Maximale Werte werden fünf bis sieben Tage nach der Ovulation erreicht. Die Konzentration liegt dann zwischen 5 und 20 ng/ml, wobei es grosse individuelle Unterschiede gibt. Mit der Luteolyse sinken die Werte wieder ab, um bis zur Rosse minimale Werte zu erreichen. Progesteron hemmt die GnRH- sowie die LH-Freisetzung während des Diöstrus, so kann kein neuer Östrus beginnen, ehe die Progesteronkonzentration auf basale Werte unter 1 ng/ml gesunken ist. Auf die FSH-Ausschüttung scheint Progesteron keinen Einfluss zu haben, da in der Lutealphase der zweite FSH-Anstieg liegt.

Bei ausgebliebener Konzeption wird vom Endometrium etwa ab dem 14. Tag des Zyklus Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) gebildet (Abbildung 2). Dieses Hormon bewirkt die Luteolyse, die Plasmaprogesteronkonzentration sinkt innerhalb von 24 bis 48 Stunden auf Basalwerte ab (Davies Morel, 2003).

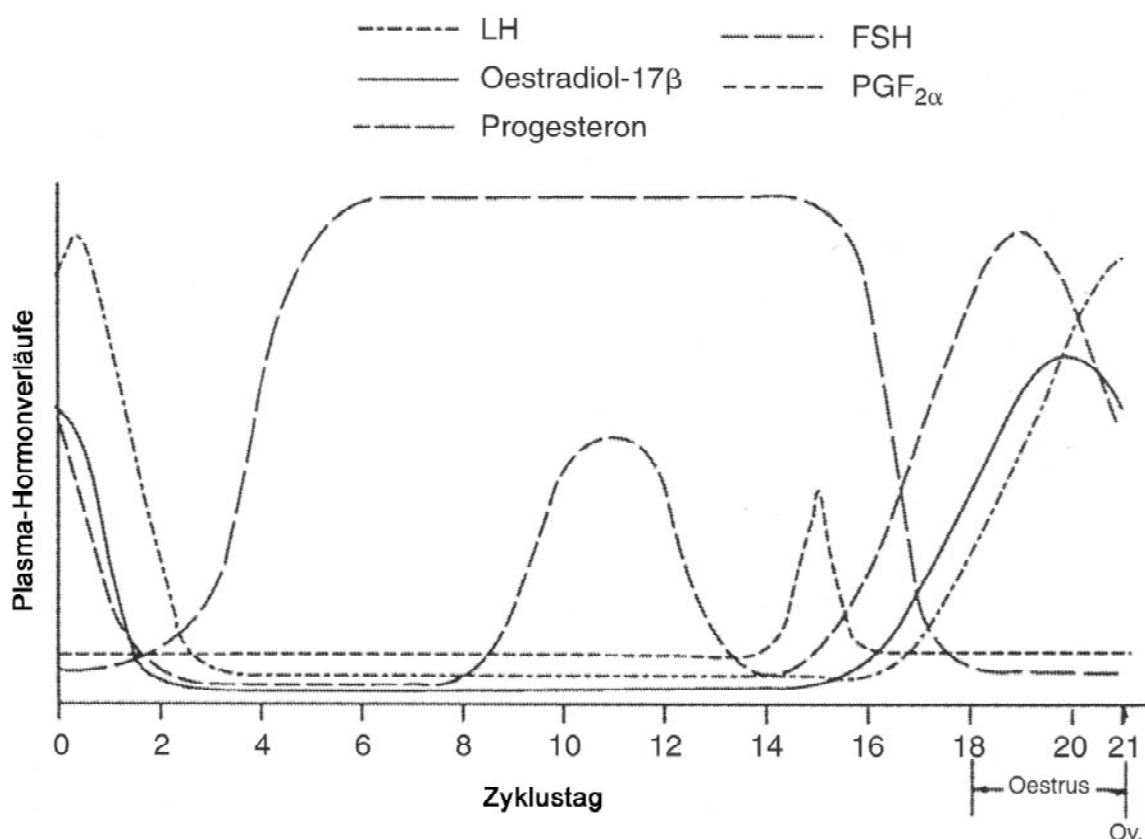


Abbildung 2: Zusammenfassende Darstellung der Hormonkonzentrationsverläufe während des Zyklus der Stute (Davies Morel, 2003).

2.5 Zyklusansprache bei der Stute

Exogene Östrusdetermination

Die Verhaltensänderungen und äusserlichen Anzeichen einer Stute im Östrus sind sehr subtil, so dass eine genaue Beobachtung nötig ist, um die Rosse zu erkennen. Im Diöstrus verhält sich die Stute, wie auch im Anöstrus und der Gravidität, dem Hengst gegenüber feindlich. Sie zeigt Abwehrreaktionen wie das sogenannte „Abschlagen“. Während des Proöstrus lässt diese Abwehrbereitschaft nach.

Im Östrus ändert sich das Temperament der Stute, manche Tiere werden ruhiger und träger, andere werden nervöser und zeigen quiekende Lautäusserungen. Gegenüber anderen Stuten kann ein pseudomaskulines Verhalten auftreten (Nishikawa und Hafez, 1962). Typische Verhaltensmuster im Östrus sind das sogenannte „Blitzen“ (Klitoriskontraktionen), das Absondern von Rosseschleim, das Dulden des Hengstes sowie das Anheben und zur Seite legen des Schweifes. Diese Verhaltensänderungen können in der Praxis gut an einem Abprobierhengst getestet werden. Auch scheinbare Abwehrbewegungen wie das Ausschlagen bei Berührungen durch den Hengst gehören zum normalen Sexualverhalten (Schaetz, 1982). Zu beachten ist, dass die Stute bis zu 12 Stunden *post ovulationem* noch Deckbereitschaft gegenüber dem Hengst zeigt, eine Ovulation kann somit nur retrospektiv festgestellt werden. Dies erklärt sich durch das über die Ovulation hinaus anhaltende LH-Plateau bei der Stute (Ginther et al., 2005). Ginther (1992 b) stellte fest, dass durch die Kombination von Dulden, Blitzen, Schweifheben und Aufkrümmen des Rückens 84,1 % der Stuten richtig in der Rosse erkannt wurden. Nach Andrews und McKenzie (1941) erreicht die Intensität der äusseren Brunstsymptome ein bis zwei Tage *ante ovulationem* ihr Maximum.

Endogene Östrusdetermination

Ein Verfahren, um die endogenen Östrussymptome zu erheben, ist die transrektale Untersuchung. Dabei werden die Befunde am Uterus und an den Ovarien mittels Palpation oder Sonographie erhoben.

Der Uterus weist in der Rosse der Stute einen verminderten Tonus auf und die Hörner erscheinen etwas dünner. Während der Brunst zeigt er in der Sonographie das sogenannte "Radspeichenphänomen", da sich das Endometrium durch die östrogenbedingte Ödematisierung in Falten legt (Hayes et al., 1985; LeBlanc, 1992).

Gegen Ende des Östrus sinkt die Östrogenkonzentration im peripheren Blut, so dass das Radspeichenphänomen schon präovulatorisch nachlässt.

Die Palpation der Ovarien stellt den wichtigsten Punkt der transrektalen Östrusbestimmung dar. Dabei werden Grösse, Grössenveränderungen und die Konsistenz des dominanten Follikels beurteilt.

Die Follikelgrösse beträgt ante ovulationem durchschnittlich 3,5 bis 5,5 cm, wobei 90 % der Follikel grösser als 3,5 cm sind (Rödiger und Bostedt, 2004). Die täglichen Wachstumsraten der Einzelfollikel liegen zwischen 1,4 und 2,7 mm/Tag (Will et al., 1988; Hohenhaus und Bostedt, 1990; Pierson und Ginther, 1990). Die letzten 36 Stunden vor der Ovulation sistiert das Follikelwachstum (Weitkamp, 1990; Rödiger und Bostedt, 2004). Bis drei Tage *ante ovulationem* haben die Follikel eine weitgehend runde Form, die dann zur Ovulation hin zunehmend oval bis unregelmässig wird (Kähn und Leidl, 1987; Will et al., 1988; Townson und Ginther, 1989). Die Konsistenz des Follikels entwickelt sich im Verlaufe des Östrus von einer prallen zu einer weichen, fluktuierenden Konsistenz.

Durch die Anwendung der transrektalen Sonographie ist der Ovulationszeitpunkt mit relativ grosser Wahrscheinlichkeit vorherzusagen. Die stattgefundenene Ovulation ist gut mittels der sonographischen Untersuchung darzustellen.

Mittels Ultraschall lässt sich die Wanddicke des dominanten Follikels messen, die als Follikelwandindex ausgedrückt werden kann. Bei einem Follikelwandindex von 0 ist keine Wand darstellbar. Ein Index von 1 weist eine Wandstärke von bis zu 1 mm auf, ein Index von 2 eine Wandstärke von mehr als 1 mm. Der Anteil des Wandindex 2 steigt in den Tagen vor der Ovulation von 11 auf 59 %. Bei einem Wandindex von 3 ist die Wand infolge der Ovulation oder der Corpus luteum-Bildung stark verdickt (Hohenhaus und Bostedt, 1990).

Das *Corpus luteum* ist bei der Stute nicht palpierbar (Schnurrbusch und Vogler, 2002). Um das Vorhandensein eines Gelbkörpers festzustellen, muss auf die Sonographie sowie die Progesteronbestimmung zurückgegriffen werden. 50 % der *Corpora lutea* entwickeln einen blutgefüllten Hohlraum, dieser ist etwa 24 Stunden *post ovulationem* erkennbar. Er wird mit zunehmendem Abstand zur Ovulation kleiner. Somit können durch die sonographische Beurteilung des *Corpus luteums* Rückschlüsse auf den zeitlichen Abstand zur vorangegangenen Ovulation gezogen werden (Pierson und Ginther, 1985).

Zusätzlich zur rektalen Untersuchung sollte eine Vaginoskopie durchgeführt werden, um die zyklischen Veränderungen von Vagina und Zervix darzustellen (s. 2.6). Die *Portio vaginalis cervicis* zeigt sich im Östrus hyperämisch am Boden des *Cavum vaginae*. Sie ist relaxiert, ödematisiert und öffnet sich für 3 bis 4 Finger. Aus dem Uterus und der Zervix wird dünnflüssiger Schleim sezerniert (LeBlanc et al., 2003).

Die Messung des elektrischen Widerstandes des Brunstschleimes zur Östrusbestimmung bei der Stute hat sich nicht bewährt (Squires et al., 1981).

Einige ältere Arbeiten beschreiben die zyklischen Veränderungen in Vaginalabstrichen der Stute (Hellich, 1940; Maier, 1940). Da die Zyklusdetermination durch die oben beschriebenen klinischen Untersuchungen bei der Stute jedoch problemlos durchzuführen ist, hat sich dieses diagnostische Verfahren, im Gegensatz zum Hund, beim Pferd nicht durchgesetzt (Bader et al., 1978).

Hormonelle Östrusdetermination

Es besteht die Möglichkeit, über wiederholte Progesteronbestimmungen die Ovulation nachzuweisen. Durch die Anbildung des *Corpus luteum* und dessen Progesteronsynthese steigen die Werte im Blut am ersten Tag nach der Ovulation auf über 1 ng/ml an (Ginther, 1992 c; Bostedt und Lehmann, 1994). Für die Progesteronbestimmung befinden sich mehrere semiquantitative Testverfahren im Handel, mit denen jedoch eine prospektive Ovulationsdetermination nicht möglich ist (Bostedt und Lehmann, 1994). Im Östrus liegen die Progesteronwerte unter 1 ng/ml (LeBlanc, 1992). Durch einen Serumprogesteronanstieg um 0,5 ng/ml konnte in einer Studie in 88 % der Fälle die Ovulation vorhergesagt werden (Hinrichs und Kenney, 1987). Im Diöstrus schwanken die individuellen Progesteronkonzentrationen zwischen 4 und 22 ng/ml (Ginther, 1992 c; Hoppen, 1995).

Die Konzentration der Östrogene beginnt 6 bis 8 Tage vor der Ovulation anzusteigen (Ginther, 1992 c). Das Maximum der Östrogenkonzentration im Blutplasma liegt etwa zwei Tage *ante ovulationem* (Daels et al., 1991; Meyer-Scheel, 2005). Hier werden Werte von 10 bis 15 pg/ml erreicht (Davies Morel, 2003). Die individuellen Schwankungen sind jedoch zu stark, als dass ihre Östrogenbestimmung zur Ovulationsprädiktion genutzt werden könnte (Munroe et al., 1979; Michel et al., 1987; Handler und Aurich, 2005). Während der Ovulation sinkt die Östrogenkonzentration und erreicht 1 bis 2 Tage *post ovulationem* diöstrisches Niveau (Ginther, 1992 c).

Da die maximale LH-Konzentration der Stute erst postovulatorisch erreicht wird, ist die Ovulationsdetermination mittels LH-Bestimmung nur retrospektiv möglich.

Aufgrund des schwankenden FSH-Verlaufes und individueller Maximalwerte, ist eine Ovulationsdetermination auch durch die FSH Bestimmung nicht möglich (Aurich und Klug, 1993).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass anhand der Bestimmung von Östradiol-17 β und Progesteron eine Einordnung in die Zyklusstadien möglich ist. Zur Vorhersage des Ovulationszeitpunktes sind Hormonanalysen jedoch wenig geeignet.

2.6 Zyklusabhängige morphologische Veränderungen der Zervix

Makroskopische Veränderungen der Zervix

Proöstrus/Östrus

Die Konsistenz der Zervix wird zunehmend weicher und sie senkt sich auf den Vaginalboden (LeBlanc, 1992). Zum Zeitpunkt der maximalen Relaxation liegt die komplette *Portio vaginalis cervicis* flach am Vaginalboden. Bei Maidenstuten relaxiert sich die Zervix in einem geringeren Grad im Vergleich zu pluriparen Tieren (Greenhoff und Kenney, 1975; LeBlanc et al., 2003). Aufgrund steigender Östrogenkonzentrationen im Blut ist die Zervikalschleimhaut ödematisiert, hyperämisch und zeigt eine Schleimsekretion. Die Zervix nimmt im Vergleich zum Diöstrus deutlich an Grösse zu (Lieux, 1970; Hein, 2000). Üblicherweise liegt die Schleimhaut des *Orificium externum* im frühen Östrus in ödematisierten Falten, die zum Zeitpunkt der Ovulation wieder abflachen. Diese Konfiguration der Zervix wird in der Literatur als "verwelkte Rose" beschrieben (LeBlanc, 1992). Die Öffnung des *Orificium externum* stellt sich als horizontaler Spalt dar (LeBlanc, 1992). Es öffnet sich soweit, dass es für drei oder mehr Finger passierbar wird. Manchmal lässt sich sogar die ganze Hand einführen (Greenhoff und Kenney, 1975). Die dorsalen Falten des äusseren Muttermundes verdecken das *Orificium externum* (El-Banna und Hafez, 1972). Durch die vermehrte Schleimproduktion unter dem Östrogeneinfluss erscheint die Schleimhautoberfläche von Zervix und Vagina stark glänzend.

Diöstrus

Die Schleimhaut von Vagina und Zervix wird blass und trocken. Die Farbe des Schleimes ist typisch grau mit einem leichten Gelbstich. Die *Portio vaginalis cervicis* steht zentral in das Vaginallumen ein und ist fest kontrahiert. Der maximale Tonus der Zervix wird zwischen dem 5. und 10. Tag des Diöstrus erreicht (Andrews und McKenzie, 1941).

Anöstrus

Durch die fehlende Steroidhormonproduktion zeigt sich im Anöstrus ein typisches Bild der Zervix. Sie wird atonisch und ist oft etwas geöffnet. Die Schleimhaut ist blass bis weiss und zeigt nur bei Kontakt mit Luft eine leichte Rötung (LeBlanc et al., 2003).

Gravidität

Die *Portio vaginalis cervicis* stellt sich klein, fest und knospenartig dar (Lieux, 1970). Sie ist bedeckt von zähflüssigem Schleim und das *Orificium externum* ist fest verschlossen (Nishikawa und Hafez, 1962).

Mikroskopische Veränderungen

Proöstrus/Östrus

Schon Hammond und Wodzicki (1940) beschrieben zyklische Veränderungen am Epithel der Zervix. Die Epithelzellen der *Cervix uteri* des Pferdes sind während des Östrus höher, geschwollen und mit Schleim gefüllt (Ginther, 1992 a). Zilienzellen machen im Proöstrus und Östrus des Rindes weniger als 10 % aus (Wrobel, 1971). Fuchsinophile Zylinderzellen, die vollständig mit Schleimkomplexen gefüllt sind, stellen in dieser Zyklusphase die zahlenmässig dominierende Zellpopulation des bovinen Zervikalepithels dar. Während des Östrus werden die Kollagenbündel durch grosse Zwischenräume getrennt. Als stationäre Zellen im Zervixstroma überwiegen die Fibroblasten. Die Stromakapillaren sind weitgestellt (Wrobel, 1971).

Bei der Stute erscheint das Zytoplasma der Zellen des luminalen Epithels im Östrus durch zahlreiche Vakuolen heller. Der Anteil zilientragender Zellen wird bei der östrischen Stute auf 60 bis 80 % geschätzt (Hein, 2000).

Die *Lamina propria mucosae* zeigt während des Östrus eine verstärkte Vaskularisation und Ödematisierung. Der Gehalt an Mucopolysacchariden ist deutlich erhöht (Fateh El-Bab und El-Naggar, 1975).

Während des Östrus kommt es zu einer verstärkten Infiltration des equinen zervikalen Gewebes mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen (Huchzermeyer et al., 2003). Mastzellen kommen beim Rind zur Zeit des Proöstrus im zentralen Stroma der Primärfalten und im intermuskulären Bindegewebe in mässiger Zahl vor. Während des Östrus fehlt diese Zellart fast völlig. Diese Tatsache könnte auf eine stattgefundene Entspeicherung der Granula hinweisen, da die angewandte histochemische Technik nur die granulareiche Form erfasste (Wrobel, 1971).

Im Präöstrus und Östrus findet sich eine maximale Ansammlung von Immunglobulin A -Plasmazellvorläufern in der Zervikal- und Vaginalschleimhaut bei Mäusen. Ein Minimum wird im Met- und Diöstrus erreicht (McDermott et al., 1980).

Der Mukus der Epithelzellen wird um den Ovulationszeitpunkt dünnflüssiger und reichlicher (El-Banna und Hafez, 1972).

Metöstrus

Beim Rind beginnen die Zylinderzellen im Metöstrus abzuflachen (Wrobel, 1971). Die Zahl der Zilienzellen, der Basalzellen und der Mastzellen steigt im Vergleich zum Östrus, die Fibroblasten werden hingegen weniger (Wrobel, 1971). Im späten Metöstrus / frühen Diöstrus des Rindes erreicht die Zahl der Zilienzellen mit 10 bis 20 % der Epithelzellen ihr Maximum. Mastzellen finden sich gehäuft im Bindegewebe der Tertiärfalten und zwischen den Muskelbündeln. Maxima werden im späten Metöstrus und frühen Diöstrus erreicht.

Diöstrus

Im Diöstrus besitzen die Epithelzellen der equinen Zervix ein eher kubisches Erscheinungsbild mit nur geringer Schleimfüllung (Ginther, 1992 b). Beim Rind wird im Diöstrus eine maximale Abflachung der Zylinderzellen erreicht (Wrobel, 1971).

Die Kollagenbündel liegen im Zervixstroma dicht zusammen. Ausserhalb des Östrus ist nur eine geringe Menge hochviskösen Schleimes in der Zervix zu finden. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Konsistenz des Zervikalschleimes und dem Vorhandensein eines funktionell aktiven *Corpus luteum*. Mit steigender lutealer Aktivität wird der Mukus dicker und adhäsiver (El-Banna und Hafez, 1972).

Eosinophile Granulozyten befinden sich in der *Lamina propria mucosae* der Zervix diöstrischer Stuten in einer Dichte von 1,9 Zellen/mm², Mastzellen weisen eine Dichte von 3,1 Zellen/mm² auf (Wehrend et al., 2005).

Die Zahl der Mastzellen im Zervikalgewebe des Rindes erreicht in dieser Zyklusphase ihr Maximum (Wrobel, 1971).

Plasmazellen kommen bei der Stute in allen Geweben des Genitaltraktes vor, die höchste Dichte findet sich in der Zervikalschleimhaut. Ein Einfluss des Brunstzyklus auf die Plasmazellzahl beim Pferd konnte jedoch nicht festgestellt werden (Widders et al., 1985).

2.7 Endokrinologische Steuerung der morphologischen Veränderungen der Zervix

Die morphologischen Veränderungen der Zervix unterliegen hormonellen Regulationen. Einfluss nehmen hierbei neben den Östrogenen und Progesteron auch Prostaglandine, Relaxin und Oxytocin. Als Mediatoren der hormonellen Effekte dienen Fibroblasten, Leukozyten und glatte Muskelzellen. Es ist bekannt, dass all diese Zelltypen in verschiedenen Geweben und bei verschiedenen Tierarten in unterschiedlicher Weise auf Hormone reagieren (Dobson, 1988). So können aus einzelnen Ergebnissen keine verallgemeinernden Schlüsse gezogen werden.

Östrogene

Der Einfluss der Östrogene auf die equine Zervix wird mit einer Erweichung des Bindegewebes sowie einer Aktivierung der lokalen Komponenten des Immunsystems in Zusammenhang gebracht.

In mehreren Studien konnte belegt werden, dass die Bindegewebsmatrix der Zervix unter hormoneller Kontrolle durch Progesteron und Östrogen steht (Gordon und Calder, 1977; Liggins, 1981; Wallis und Hillier, 1981; Rajabi et al., 1991).

Gordon und Calder (1977) berichteten von einer Erweichung der Zervix unter der Behandlung mit Östradiol-17 β . Nach Verabreichung von Östradiolbenzoat an weibliche ovariectomierte Mäuse waren die Kollagenfaserbündel der behandelten Tiere weit verteilt. Die Fibroblasten zeigten sich vergrößert und enthielten ein hoch entwickeltes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komponenten (Leppi und Kinnison, 1971). In Organkulturen ingravider Meerschweinchenzervices konnte

nachgewiesen werden, dass physiologische Konzentrationen an Östradiol-17 β den Abbau von Typ I Kollagenfasern stimulieren (Rajabi et al., 1991).

Auch die physiologischen Umbauprozesse der Zervix während der Gravidität sind östrogenabhängig. Dies zeigte sich an Frauen mit einem Plazenta-Sulphatase-Mangel, die einen sehr geringen Östrogengehalt im Blut aufwiesen. Ihre Zervices erschienen während der gesamten Gravidität wie im nichtgravidem Stadium. Sie zeigten keine Anzeichen von Hypertrophie in der Frühgravidität und keine Erweichung in der Spätgravidität (Liggins, 1978).

Neben der Wirkung auf die mechanischen Eigenschaften der Zervix nehmen die Östrogene auch Einfluss auf verschiedene Komponenten des Immunsystems in der Zervix.

Die Applikation von Östradiol an weibliche ovariectomierte Ratten führte zu einem Abfall des IgA und IgG-Gehaltes im zerviko-vaginalen Sekret (Wira und Sullivan, 1985). Die Behandlung mit Progesteron erbrachte den gleichen Effekt, der unabhängig von uterinen Einflüssen zu bestehen schien. Wurde die Verbindung Zervix-Uterus durch eine Ligatur unterbrochen, führte die Östrogen-Behandlung nach wie vor zu einem Abfall des IgA-Spiegels. Umgekehrt zu diesem inhibitorischen Effekt fand durch Östrogen-Behandlung eine Akkumulation von IgA im Uterus statt (Wira und Prabhal, 1990). In weiteren Studien konnte belegt werden, dass Östradiol sowohl die Rekrutierung der Immunglobuline aus dem Blut, als auch die Produktion der sekretorischen Komponente, die für den Transport des IgA aus dem Gewebe in die Sekrete verantwortlich ist, anregt (Sullivan und Wira, 1983; Sullivan und Wira, 1984).

Bassett (1962) vermutete, dass Östrogene auch für die Infiltration von kollagenase-aktiven Leukozyten in die Zervix am Ende der Gravidität verantwortlich sind.

Hawk et al. (1960) zeigten am Kaninchen, dass Östrogene durch Förderung der Leukozytenmigration die Elimination von *Escherichia coli* aus dem Uterus fördern. Bei Pferden konnte eine gesteigerte intrauterine Phagozytoseaktivität sowie eine schnellere Eliminierung von *Streptococcus zooepidemicus* aus dem Uterus unter der Behandlung mit Östrogenen festgestellt werden (Ganjam et al., 1982).

Die Verabreichung von Östradiol-17 β an gravide ovariectomierte Ratten führte zur Invasion von eosinophilen Granulozyten in die Zervix (Luque et al., 1996; Luque et al., 1998; Ramos et al., 2000). Durch die Behandlung mit dem Östradiol-17 β -

Antagonisten Tamoxifen konnte dieser Effekt aufgehoben werden. Aufgrund der Hemmung des Östrogeneffektes durch Actinomycin-D, einem Inhibitor der mRNA-Synthese, liess sich vermuten, dass sich die Wirkung der Östrogene auf genomischer Ebene entfaltet (Ramos et al., 2000).

Progesteron

Progesteron ist ein C21-Steroid, das vor allem im *Corpus luteum*, aber auch in der Nebennierenrinde sowie in der Plazenta gebildet wird (Döcke, 1994). Die Wirkung wird über intrazelluläre Steroidhormonrezeptoren vermittelt. An der equinen Zervix führt Progesteron zu einer Hemmung des Abbaus des zervikalen Kollagens sowie zu einer Inhibition des zellulären Immunsystems.

Die Konzentration der Progesteronrezeptoren in der equinen Zervix unterliegt zyklischen Schwankungen. Während der Lutealphase werden maximale Werte erreicht. Im Vergleich zum Uterus weist die equine Zervix eine geringere Rezeptorendichte auf, was auch bei Kühen, Jungsauen sowie beim Menschen beobachtet werden konnte (Re et al., 1995).

Progesteron nimmt Einfluss auf die Auflösungsprozesse von zervikalem Kollagen. Die Synthese der Kollagenase wird durch Progesteron über eine Suppression der mRNA-Synthese vermindert (Wallis und Hillier, 1981). So verhindert Progesteron dosisabhängig den Netto-Verlust von Kollagen beim Menschen (Hillier und Wallis, 1981). Einen weiteren Erklärungsansatz für den Hemmmechanismus des Progesterons auf die Kollagenaseproduktion lieferten Jeffrey und Koob (1980): Progesteron senkte den Spiegel der zyklischen Nukleotidphosphodiesterase, die zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) abbaut. Der dadurch steigende cAMP-Spiegel hemmt die Kollagenasesynthese. Sato et al. (1991) berichteten, dass Progesteron die Produktion von „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) beschleunigt. Diese TIMPs hemmen effektiv die aktivierte Kollagenase. Zusätzlich wurde beschrieben, dass die Biosynthese von Kollagenase und Stromelysin sowohl durch Progesteron als auch durch Östradiol-17 β unterdrückt wird. In kultivierten Bindegewebszellen konnte gezeigt werden, dass Stromelysin ein Aktivator der Prokollagenase ist. So war die Anwesenheit von Stromelysin erforderlich, damit die Kollagenase ihre volle Aktivität erreichen konnte (Sato et al., 1991). Der von Rajabi et al. (1991) beschriebene östrogeninduzierte Abbau von Typ I Kollagenfasern in der

Meerschweinchenzervix wird durch die Applikation von Progesteron komplett geblockt.

Der Abbau der extrazellulären Matrix wird als wichtiger Faktor in der Erweichung und Dilatation der Zervix im peripartalen Zeitraum beschrieben. An diesem Prozess sollen Matrix Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt sein. Die Aktivität dieser MMPs wird durch Inhibitoren reguliert (TIMPs). Imada et al. (1997) beschrieben den Einfluss von Progesteron auf die MMPs und TIMPs beim Kaninchen. Ein hoher Plasma-Progesteron-Spiegel während der frühen und mittleren Trächtigkeit beugt einem Abbau der extrazellulären Matrix vor, indem die Produktion von TIMPs gesteigert und gleichzeitig die Produktion von MMPs gesenkt wird. Sinkt die Progesteronkonzentration kurz vor der Geburt, entfallen diese Effekte und die zervikale Dilatation und Erweichung können beginnen.

Die Ergebnisse von Stiemer (1988) zeigten, dass eine Blockade des Progesteronrezeptors durch Antigestagene ausreicht, um das hormonelle Milieu und damit den Bindegewebsstoffwechsel derart zu verändern, dass eine vorzeitige Reifung der Rattenzervix in der Spätgravidität möglich wird.

Im Gegensatz zu den Östrogenen, die im Allgemeinen das Immunsystem aktivieren, stellt Progesteron eine supprimierende Komponente dar.

Zwar konnte durch Luque und Montes (1989) noch eine massive Infiltration der Zervix mit eosinophilen Granulozyten durch Progesteron festgestellt werden, was jedoch in weiteren Studien dieser Arbeitsgruppe widerlegt wurde. Diese Ergebnisse zeigten, dass Progesteron die östrogeninduzierte Infiltration von eosinophilen Granulozyten in die Zervix bei der Ratte hemmt (Luque et al., 1996). Ramos et al. (2000) gewannen in einer Folge-Studie an hormonbehandelten ovariectomierten Ratten weitere Erkenntnisse. Progesteron verhinderte auch hier die Infiltration der Zervix mit eosinophilen Granulozyten nach Östradiol-17 β -Behandlung. Wurden die Tiere jedoch gleichzeitig mit dem Antiprogesteron RU-486 behandelt, war die hemmende Wirkung des Progesterons aufgehoben.

Die Behandlung ovariectomierter Stuten mit Progesteron führte zu einer verminderten Phagozytoseaktivität und einer verzögerten Erregerelimination nach Inokulation von *Streptococcus zooepidemicus* in den Uterus (Ganjam et al., 1982). Hawk et al. (1960) zeigten, dass die Elimination von *Escherichia coli* aus dem Uterus

von Kaninchen aufgrund einer Hemmung der Leukozytenmigration durch Progesteron verzögert wird.

Prostaglandine (PG)

Die Applikation von PGE₂-Tabletten in den Zervikalkanal diöstrischer Stuten führte innerhalb von 30 bis 90 Minuten zu einer signifikanten Erweichung und Ödembildung an der Zervix (Volkman et al., 1995). Wenige Minuten nach dem Einlegen der Tablette nahm der Tonus des Uterus zunächst signifikant zu, was für 60 bis 90 Minuten anhielt. Bei graviden Stuten nahe dem Geburtstermin zeigte sich der gleiche Effekt. Die Geburt wurde jedoch nicht eingeleitet.

Die Verabreichung von PGE₂ zum Geburtszeitpunkt führte an der unreifen Zervix zu einer Reduktion des Gesamtkollagengehaltes sowie zu einer Zunahme der kollagenolytischen Aktivität (Ekman et al., 1986).

Auch Fitzpatrick und Liggins (1980) beschrieben eine lokalisierte zervikale Erweichung und Dilatation nach intrazervikaler Infusion von PGF_{2α} oder PGE₂. Es konnten jedoch keine histologischen Veränderungen in der Zusammensetzung des zervikalen Bindegewebes nach Behandlung festgestellt werden. Ungeklärt blieb, ob die Applikation von Prostaglandinen einen direkten Effekt auf die Zervix ausübt oder ob die Veränderungen an der Zervix eine Folge von Uteruskontraktionen, induziert durch die Prostaglandine, sind (Hillier und Wallis, 1981). Eine Steigerung der uterinen Aktivität durch die Gabe von Oxytocin ist, im Vergleich zu den Veränderungen nach Prostaglandinverabreichung, jedoch relativ ineffektiv in der Induktion zervikaler Veränderungen (Fitzpatrick und Liggins, 1980).

Ellwood et al. (1981) beschrieben PGE und Prostazyklin als lokale Faktoren, die an den Veränderungen der Zervix *intra partum* beim Schaf beteiligt sind. Sie vermuteten, dass diese Hormone über die Stimulation der Kollagenase-Aktivität wirken.

Die Behandlung von Fibroblastenkulturen mit PGF_{2α} führte innerhalb von 20 Stunden zu einer Verdopplung der Syntheserate von sauren Glykosaminoglykanen sowie zu einem Anstieg hexosaminhaltiger Substanzen um 300 % innerhalb der ersten sechs Stunden. Die meiststimulierte Fraktion bei den hexosaminhaltigen Substanzen war Hyaluronsäure (Murota et al., 1977). Die Behandlung von graviden Ratten mit PGF_{2α} führte zu einer signifikanten Erniedrigung des Wassergehaltes in der Zervix. In der

gleichen Studie bewirkte die Applikation von PGE_2 eine Reduktion des Gehaltes an löslichem Kollagen im zervikalen Gewebe (Bienkiewicz, 1995).

Bryman et al. (1985) stellten eine Inhibition der Muskelkontraktion der Zervix durch PGE und Prostazyklin fest, wohingegen $\text{PGF}_{2\alpha}$ keine Auswirkung auf die Zervixkontraktilität hatte.

Eine Infiltration der Zervix mit eosinophilen Granulozyten liess sich sowohl bei intrapartalen als auch prostaglandinbehandelten Schafen beobachten (Fitzpatrick und Liggins, 1980).

Relaxin

Bei graviden Ratten zeigte sich in der Picrosirius-Färbung eine geringe Doppelbrechung von polarisiertem Licht im Zervixstroma, was in einer Reduktion der Kollagenfaserbündeldichte begründet ist. Die Doppelbrechung bei graviden ovariectomierten Ratten ist dagegen hoch. Durch die Behandlung von graviden ovariectomierten Ratten mit Relaxin konnte, wie bei graviden Ratten, in der Picrosirius-Färbung eine verminderte Doppelbrechung festgestellt werden (Luque et al., 1998). Dieser Effekt von Relaxin auf die Zervix der Ratte war jedoch östrogenabhängig (Sherwood, 1994). Die alleinige Wirkung des Relaxins bei den ovariectomierten Ratten war darauf zurückzuführen, dass die Tiere noch unter dem endogenen Östrogeneinfluss standen, welcher in der späten Trächtigkeit ansteigt.

Auch Leppi und Kinnison (1971) beschrieben bei alleiniger Behandlung ovariectomierter Ratten mit Relaxin dicht gepackte Bündel an Kollagenfibrillen in der Zervix. Erst nach einer Kombinationsbehandlung mit Relaxin und Östradiolbenzoat kam es zu einer Auflockerung des Kollagennetzwerkes sowie zur Vergrösserung der Fibroblasten mit hoch entwickeltem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Komponenten. Dies zeigte, dass der Effekt des Relaxins auf das Zervixstroma eine Östrogenabhängigkeit aufweist. Relaxin fördert die Proliferation von Stroma- und Epithelzellen in der zweiten Hälfte der Gravidität (Burger und Sherwood, 1998). Dies bestätigten vorangegangene Untersuchungen, in denen ein relaxinabhängiger DNA-Anstieg in der Rattenzervix um das 1,5 fache von der Mitte der Gravidität bis zum Partus ermittelt werden konnte (Burger und Sherwood, 1995).

Harris und Krane (1974) vermuteten als Ursache für die Auflockerung des Kollagennetzwerkes eine Stimulation der Produktion oder der Freisetzung von kollagenolytischen Enzymen. Mushayandebvu und Rajabi (1995) konnten den

biochemischen Beweis erbringen, dass Relaxin an der Zervixdilatation über die Stimulation einer interstitiellen Kollagenase beteiligt ist. Relaxin bewirkt eine Zunahme der nicht-kollagenen Matrix, was mitunter durch eine Erhöhung des Wassergehaltes bedingt wird (Zarrow und Yochim, 1961). Downing und Sherwood (1986) stellten fest, dass unter dem Einfluss von Relaxin auch die Hyaluronsäurekonzentration ansteigt, was die erhöhte Wasserbindungskapazität erklärt.

Oxytocin

Oxytocin ist ein zyklisches Peptid, das im Hypothalamus gebildet wird. Bei der Stute wird es zur Einleitung der Geburt eingesetzt (Nett, 1992). Ein Einfluss von Oxytocin auf die Bindegewebsmatrix beim Menschen konnte nachgewiesen werden. In einer Studie liess sich *in vitro* der Einbau von Hydroxyprolin in das Zervixbindegewebe von graviden Frauen durch 100 mU/ml Oxytocin um 60 % reduzieren. Dieser Effekt zeigte eine Dosisabhängigkeit. Die zusätzliche Applikation von Östradiol-17 β potenzierte die Wirkung des Oxytocins. Prolin und Hydroxyprolin stellen zirka 20 % der Aminosäurezusammensetzung von Kollagen dar. Diese hormon-induzierten Veränderungen des Hydroxyprolineinbaus in das zervikale Bindegewebe sind ein Indiz für einen veränderten Kollagenmetabolismus (Wiqvist et al., 1984; Wiqvist et al., 1985).

2.8 Diagnostische Verfahren zur Beurteilung der Zervix

Die Standarduntersuchungsverfahren, um Befunde an der Zervix zu erheben, sind die Adspektion mittels der Vaginoskopie sowie die transrektale sonographische Untersuchung. Mit Hilfe der Vaginoskopie ist die *Portio vaginalis cervicis* gut zu beurteilen. Angewandt wird für diese Untersuchung in der Regel ein Spreizspekulum nach Polansky. Zur ausschliesslichen Beurteilung der Zervix würde auch ein Röhrenspekulum ausreichen, jedoch lassen sich mit einem Spreizspekulum auch Tupferproben entnehmen und durch leichte Drehung ist zudem das *Orificium urethrae externum* darstellbar (Handler, 2005). Beurteilt werden an der Zervix Öffnungsgrad, Charakter und Farbe der Schleimhaut, Form, Position sowie ihre Intaktheit. Der Grad der Hyperämie sollte beurteilt werden, um physiologische und

pathologische Veränderungen differenzieren zu können. Wichtig hierbei ist eine rasche Beurteilung der Schleimhautfarbe, da durch den Kontakt mit Luft eine artifizielle Rötung zustande kommen kann. Anatomische Abweichungen und Verletzungen sind durch die Vaginoskopie ebenfalls zu verifizieren. Zusätzlich sollte auf Varizen im Bereich der *Portio vaginalis cervicis* geachtet werden (Foster et al., 1997). Das Vorkommen sowie die Qualität des Schleimes aus dem *Orificium externum cervicis* sind ebenfalls wichtige zu erhebende Parameter (LeBlanc et al., 2003).

Die Befunderhebung an der *Portio vaginalis cervicis* wurde bereits von Götze (1949) anhand des folgenden Schemas standardisiert:

Form der *Portio vaginalis cervicis*:

- Z = zapfenförmig (physiologisch, nicht östrisch oder gravid)
- R = rosettenförmig (pathologisch oder östrisch)
- S = schlaff, lappig überhängend (pathologisch oder östrisch)
- V = verlaufend (pathologisch oder östrisch)

Öffnungsgrad des Muttermundes und des Zervikalkanales (mittels Adspektion nur zu schätzen):

- 0 = vollständig geschlossen, verklebt (Gravidität)
- 1 = *Orificium externum* kleintrichterförmig offen, Zervix passierbar für Strohhalm (physiologisch, nicht östrisch, nicht gravid)
- 2 = *Orificium externum* trichterförmig geöffnet, Zervix passierbar für Bleistift (physiologisch oder pathologisch, nicht östrisch, nicht gravid)
- 3 = *Orificium externum* und Zervix passierbar für 1 bis 2 Finger (pathologisch oder zu Beginn beziehungsweise Ende der Rosse)
- 4 = *Orificium externum* und Zervix passierbar für 3 bis 5 Finger (östrisch oder pathologisch)

Farbe der Schleimhaut der *Portio vaginalis cervicis* sowie des Vaginalkanales:

- A = blass (Frühgravidität oder pathologisch)
- B = blassrosarot (physiologisch, nicht östrisch)
- C = hyperämisch (beginnender Östrus oder pathologisch)
- D = gerötet (pathologisch)

Feuchtigkeitsgrad der Schleimhaut:

- I = trocken, klebrig (Gravidität)
- II = wenig feucht (physiologisch, nicht östrisch)
- III = mässig feucht, spiegelnd (Beginn/Ende des Östrus oder pathologisch)
- IV = stark feucht (östrisch oder pathologisch)
- V = Flüssigkeitsansammlung (vaginaler Hyperöstrus oder Urovagina)

Die Zervix der Stute zeigt stärkere zyklische Veränderungen als Vagina und Uterus (Andrews und McKenzie, 1941; Meyer-Scheel, 2005). In der Gravidität stellt sich die Zervix in der vaginoskopischen Untersuchung blass und eng verschlossen dar. In der Hochgravidität kann sie schwierig darzustellen sein, da sie durch den Zug der Frucht nach cranioventral verlagert wird.

Durch eine manuelle vaginale Untersuchung kann durch leichte Dilatation des *Orificium externum cervicis* auch der innere Teil des Zervikalkanals ertastet werden. Hier lassen sich Lacerationen und Adhäsionen palpieren, die mittels der Vaginoskopie nicht darstellbar sind (LeBlanc, 1992).

Eine weitere Methode zur Diagnostik an der Zervix ist die rektale Untersuchung. Es werden Länge, Durchmesser, Konsistenz und Beweglichkeit beurteilt (Handler, 2005). Durch den Östrogeneinfluss während der Rosse wird die Konsistenz der Zervix weicher. So ist die Zervix während des Diöstrus sehr gut zu palpieren und fühlt sich fest an. Die Relaxation beginnt im periöstralen Zeitraum und erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt der Ovulation. Zu diesem Zeitpunkt gibt die Zervix schon leichtem manuellem Druck nach (Ginther, 1992 b). Progesteron sorgt neben dem Verschluss der Zervix auch für deren Festigkeit und verminderte Biegsamkeit. Plötzliche abfallende Serum-Progesteron-Werte während der Trächtigkeit sind für eine von cranial nach caudal fortschreitende Erweichung der Zervix verantwortlich. Dies ist oft das erste klinische Anzeichen für einen frühen embryonalen Tod (Shideler, 1992).

Im Rahmen der rektalen Palpation bietet sich die transrektale Sonographie als weiterführende Untersuchung an.

Sonographisch unterscheidet sich die Zervix vom Uterus durch ein zentral gelegenes Bündel an längs verlaufenden echogenen Linien, die durch die longitudinalen

Schleimhautfalten zustande kommen (Handler, 2005). Die Schleimhaut der Zervix ist in allen Stadien des Zyklus ein Gewebe von geringer Dichte. Aufgrund der grossen Oberfläche im Inneren des Zervikalkanales erscheint die Schleimhaut in der sonographischen Darstellung zeitweise dicht. Durch die longitudinal verlaufende Primär- und Sekundärfältelung kommt es im sonographischen Bild zu einer spektralen Reflexion, die vom Winkel der Schallkopfführung abhängig ist (Day et al., 1995). Das Öffnen der Zervix im Östrus bewirkt eine weniger ausgeprägte Streifung, die mehr zerstreut wirkt und die Echogenität des *Canalis cervicis* ist vermindert. Die Zervikalmuskulatur zeigt sich während des Diöstrus echogen und verliert während des Östrus allmählich an Echogenität (Ginther, 1986). In der Graustufenanalyse steigen die Grauwerte mit einer Verminderung der Homogenitätswerte nach der Ovulation (Meyer-Scheel, 2005). Der Verlust an Echogenität im Östrus beginnt im Bereich der Mucosa und schreitet in Richtung Serosa des *Orificium externum* fort (Day et al., 1995). Die Serosa der Zervix zeigt sich während des gesamten Zyklus von gleicher Echogenität. Sie stellt sich als gut ansprechbare Grenze zur Festlegung des Zervixdiameters dar. In der Untersuchung von Day et al. (1995) wurde das zyklusabhängige Erscheinungsbild der Zervix in ein Scoresystem eingeteilt. Die Einteilung reicht von 1 bis 5, wobei die Parameter Zervixdurchmesser, Tonus sowie das sonographische Erscheinungsbild ermittelt wurden (Tabelle 1).

Im Folgenden wird die Klassifikation der sonographischen Bilder in die Ultraschallgrade 1 bis 5 erläutert:

- Grad 1: *Tunica mucosa* und *Tunica muscularis* sind schmal. Sie zeigen ein ähnliches sonographisches Erscheinungsbild. Der Zervikalkanal hat ein Lumen von maximal 1 cm Durchmesser. Es finden sich parallele echogene Linien, korrespondierend zur Längsfältelung der Schleimhaut.
- Grad 2: *Tunica mucosa* und *Tunica muscularis* sind klar voneinander abzugrenzen. Im Zervikalkanal finden sich echogene und anechogene Bezirke. Die *Tunica muscularis* ist durchgehend echogen.

- Grad 3: Die *Tunica muscularis* stellt sich cranial des *Orificium externum* mit verminderter Echogenität dar. Im Bereich des *Orificium externum* ist sie jedoch vermehrt echogen mit klarer Abgrenzung der *Tunica mucosa* zur *Tunica muscularis*. Die echogenen Segmente im Zervikalkanal werden kürzer und weniger dicht.
- Grad 4: Die *Tunica muscularis* ist in der Nähe der *Tunica mucosa* einheitlich hypoechogen, eine gute Echogenität zeigt sich nur angrenzend an die Serosa.
- Grad 5: Oberflächliche und tiefe Schichten der *Tunica muscularis* erscheinen homogen hypoechogen.

Durch die Ödematisierung der Zervix während des Östrus und in den Tagen nach der Ovulation kommt es zu einem Anstieg der Ultraschall-Grade. Grad 3 wird am Übergang vom Diöstrus zum frühen oder späten Östrus erreicht. Maximale Grade von 4 und 5 finden sich vor der Ovulation. In den ersten Tagen nach der Ovulation reduzieren sich die Grade wieder.

So stellt die transrektale Sonographie eine gute Ergänzung zur rektalen manuellen Palpation dar, da mit ihr sehr gut die Entwicklung des zervikalen Ödems beurteilt werden kann, was mittels der alleinigen rektalen Palpation nur schwer zu erfassen wäre.

Tabelle 1: Beschreibung der Zervix-Sonographie-Grade nach Day et al. (1995)

Ultraschall- Grad	Zervix- diameter	Zervix- tonus	Sonographisches Erscheinungsbild
1	2 - 2,5 cm	fest (geschlossen)	M: echogen und dünn Z: parallele hyperechogene Linien
2	2 - 3,5 cm	fest (geschlossen)	M: dick, durchgehend echogen, Verbindung Mucosa-Muscularis wahrnehmbar Z: hyperechogene Linien und anechogene Areale
3	2,5 - 3,5 cm	fest, gibt leichtem Druck nach (leicht geöffnet)	M: Verbindung Mucosa-Muscularis nur im Bereich des <i>Orificium exter- num</i> wahrnehmbar Z: schmaler im Bereich des <i>Orificium externum</i> , eventuell vorhandene echogene Linien streuen vermehrt
4	3 - 4,5 cm	schlaffer, vom Uterus abzugrenzen (offen)	M: dick, echogen nur an der Grenze zur Serosa Z: schwache Linien darstellbar, Mucosa kann echogener sein als Muscularis
5	3,5 - 5 cm	schlaff (offen)	M: homogen hypoechogen Z: schwache Linien können vorhanden sein, mit der Muscularis homogen im Erscheinungsbild

M = Muskulatur; Z = Zervikalkanal

2.9 Exfoliative Zytologie der Genitalorgane der Stute

Die ersten Berichte über mikroskopische Befunde an Vaginalabstrichen von Stuten stammen aus den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts (Sato und Suzuki, 1927). Im Jahre 1931 untersuchte Kurosawa Vaginalsekret von Stuten zur Graviditätsdiagnostik. Schatalow (1933) ermittelte zyklusabhängige Veränderungen im Vaginaausstrich von Stuten und Rindern. Im Diöstrus beschrieb er in erster Linie kernhaltige Vaginalepithelzellen, wohingegen im Östrus kernlose, verhornte Zellen und Leukozyten dominierten.

Als Verfahren zur Diagnostik von uterinen Erkrankungen bei Frauen hat sich die zytologische Untersuchung von endometrialen Abstrichen schon früh bewährt (Cary, 1943; Hecht, 1952; Romberg, 1954; Ferreira, 1956).

Die exfoliative Endometriumszytologie bei der Stute wurde 1964 durch eine Arbeit von Knudsen als diagnostisches Verfahren in die Zuchtstutenuntersuchung eingeführt. In dieser Studie konnte eine enge Korrelation zwischen einem positiven bakteriologischen Ergebnis und dem Vorkommen von neutrophilen Granulozyten im endometrialen Abstrich festgestellt werden. Die Korrelation zwischen bakteriologischem und zytologischem Ergebnis bei bakteriell bedingten Endometritiden beschrieb Knudsen (1964) als so gross, dass das Ergebnis der zytologischen Untersuchung allein in den meisten Fällen zur Diagnosestellung verlässlich ist. Der Vorteil der Zytologie liegt dabei in der schnelleren Verfügbarkeit der Ergebnisse im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung.

Dass eine gute Korrelation zwischen dem Vorkommen neutrophiler Granulozyten und der Isolation von Bakterien besteht, wurde nach den ersten Berichten von Knudsen (1964) durch zahlreiche Studien belegt (Lauer, 1977; Tillmann und Meinecke, 1980; Knudsen, 1982; Asbury, 1984; Couto und Hughes, 1984; Slusher et al., 1984; Brook, 1985; La Cour und Sprinkle, 1985; Ball et al., 1988; Reinemund, 1988; Roszel und Freeman, 1988; Brook, 1992; Wehrend et al., 2004c).

In einer Studie an 129 Stuten, bei denen sowohl eine bakteriologische als auch eine zytologische Untersuchung durchgeführt wurde, korrelierten die Befunde in 81,4 % der Fälle. 10,1 % der Proben waren bakteriologisch positiv und zytologisch negativ, 8,5 % der Tupfer bakteriologisch negativ und zytologisch positiv (Reinemund, 1988).

Waelchli et al. (1988) konnten an 243 bakteriologischen und zytologischen Befunden bei 174 Stuten eine Übereinstimmung der Ergebnisse in 88,1 % feststellen.

Es konnte gezeigt werden, dass das Endometrium auf die Inokulation von Bakterien innerhalb von 72 Stunden mit einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten reagiert (Peterson et al., 1969). Nach intrauteriner Inokulation eines bakterienfreien Filtrates aus *Streptococcus zooepidemicus* kam es bereits nach zwei Stunden zu einer neutrophilen Reaktion, deren Maximum nach 6 – 10 Stunden erreicht war (Couto und Hughes, 1985).

Es lässt sich auch ein Zusammenhang zwischen Vulvagestalt und dem zytologischen Status des Endometriums feststellen. Stuten mit einer physiologischen Vulvagestalt wiesen in 81 % der Fälle eine unauffällige Endometriumszytologie auf. Im Vergleich hierzu waren nur 46 % der Stuten mit einer alten, wieder eingerissenen Caslick-Operations-Narbe mit zytologisch negativem Befund (Hemberg et al., 2005).

In Fällen eines unspezifischen Befundes der bakteriologischen Untersuchung stellt die zytologische Untersuchung eine wichtige Entscheidungshilfe bezüglich der Behandlungsbedürftigkeit dar. Durch die direkte Beurteilung der lokalen Entzündungsreaktionen mittels der zytologischen Untersuchung kann eine Fehlinterpretation positiver und negativer bakteriologischer Befunde vermieden werden. Es gibt Autoren, die der Ansicht sind, dass ein gesunder Uterus keinen Keimgehalt aufweisen darf (Knudsen, 1964; Peterson et al., 1969; Conboy, 1978). Witherspoon et al. (1972) und Huchzermeyer (2002) wiesen nach, dass ein Bakteriennachweis nicht mit sichtbaren Entzündungsanzeichen einhergehen muss, es kann sich dabei um eine opportunistische Keimbesiedelung mit apathogenen oder fakultativ pathogenen Keimen handeln. Auch durch technisch ausgereifere Untersuchungstechniken, wie der selektiven Lavage von Uterushörnern, konnte gezeigt werden, dass eine geringgradige Keimbesiedelung in gesunden Uterushörnern vorhanden sein kann (Schmidt, 1988).

Abhängig von der Virulenz der Erreger und der Reaktivität des Gewebes finden sich verschiedenste Zustände des Endometriums, die von einer nichtreaktiven Oberflächenbesiedelung bis hin zu einer hochgradigen Entzündungsreaktion reichen (Brook, 1992). Die Variabilität des Endometriums in der Fähigkeit auf Infektionen zu reagieren stellt eine Schwierigkeit in der Beurteilung von Keimnachweisen dar (Liu, 1988). Die zytologische Untersuchung von Endometriumsabstrichen hat sich bewährt, diese Interpretationslücke zu schliessen.

Über den optimalen Zeitpunkt für die Probenentnahme zur bakteriologischen und zytologischen Untersuchung bestehen verschiedene Ansichten. Die Entnahme von Tupferproben im Östrus hat den Vorteil einer geöffneten Zervix sowie ausgiebiger endometrialer Sekretion, was zu einer erleichterten transzervikalen Passage führt (Conboy, 1978). Die reichliche Schleimsekretion stellt sicher, dass der Tupfer mit ausreichend Material in Kontakt kommt, so dass eine repräsentative Aussage getroffen werden kann. Im Anöstrus entnommene Proben werden teilweise als nicht aussagekräftig beschrieben (Solomon et al., 1972). Nach Ansicht eines Grossteils der Autoren ist die Anfertigung von uterinen Kulturen und Zytologien in der Mitte des Östrus zu präferieren (Bruner, 1951; Collins, 1964; Bain, 1966; Brandt, 1970; Gadd, 1975; Ricketts und Mackintosh, 1987). Zu diesem Zeitpunkt scheinen die uterinen Abwehrmechanismen ihr Maximum erreicht zu haben (Ganjam et al., 1982; Waelchli et al., 1993). Die Möglichkeit einer iatrogenen Infektion der Gebärmutter besteht aufgrund dessen vor allem im Diöstrus, da zu diesem Zeitpunkt die uterinen Abwehrmechanismen unter dem Progesteron-Einfluss herabgesetzt sind (Brook, 1992; Waelchli et al., 1993).

Bei der Entnahmetechnik ist unbedingt zu beachten, dass bedeckte Tupfersysteme benutzt werden, um eine Kontamination mit Keimen aus der Vagina und der Zervix zu verhindern. In Studien mit unbedeckten oder nur teilweise bedeckten Tupfern zeigte sich aufgrund dieser Kontamination eine geringe Korrelation zwischen dem Vorkommen von neutrophilen Granulozyten und dem von Bakterien (Shin et al., 1979; Wingfield Digby und Ricketts, 1982).

Als bedecktes Tupfersystem stehen der sterilisierbare Knudsenkatheter (Abbildung 3) sowie verschiedene kommerziell erhältliche Einmaltupfer zur Verfügung. Die Entnahme kann manuell oder mit Hilfe eines Spekulum erfolgen. Der Katheter wird in das *Cavum uteri* eingeführt, erst dann wird der innere Tupferträger vorgeschoben und über die Oberfläche des Endometriums bewegt. Der Tupfer ist mindestens 30 Sekunden in Kontakt mit dem Endometrium zu halten, um eine adäquate Benetzung mit Schleim, Zellen und Mikroorganismen zu gewährleisten (Schmidt, 1988). Manche Autoren präferieren die Verwendung von zwei Tupfern, einen für die bakteriologische und einen zweiten für die zytologische Untersuchung (Ball et al., 1988).

Bei der Verwendung des Knudsenkatheters besteht die Möglichkeit, Baumwolltupfer in verschiedene Ausbohrungen zu ziehen, so dass für die zytologische und die bakteriologische Untersuchung verschiedene Träger verwandt werden können. Ausserdem kann die Metallspirale für die zytologische Untersuchung auf einen Objektträger ausgestrichen werden.



Abbildung 3: Instrumente zur gleichzeitigen Entnahme von Uterustupferprobe und Endometriumszytologie: Polanski-Spekulum, Zervixfasszange nach Albrechtsen, Knudsenkatheter, Stablampe, Objektträger und sterile Pinzette (von oben nach unten).

Der Nachteil der direkten Tupferprobenentnahme liegt in der Zellverformung sowie in dem kleinen Entnahmebereich vom Endometrium, der nicht zwingendermassen den Befund des kompletten Endometriums widerspiegelt (Roszel und Freeman, 1988). Vorteile bietet die Anwendung eines Spülkatheters, wie von Schmidt (1988) angewandt. Mit ihm lässt sich Material separiert aus einem Uterushorn gewinnen. Hier ist jedoch ein bedeutend grösserer Zeitaufwand notwendig und das Endometrium wird deutlich mehr irritiert (Brook, 1992). Bourke et al. (1997) erreichten mit einem humanmedizinischen Zytologiebürstchen höhere Zelldichten in den Endometriumszytologien von Stuten im Vergleich zu den herkömmlichen Tupfersystemen. Für den praktischen Gebrauch wird die Entnahme der Proben für eine exfoliative Endometriumszytologie mittels eines bedeckten Tupfersystems als adäquat angesehen (Knudsen, 1982; Brook, 1983; Brook, 1985; La Cour und Sprinkle, 1985; Crickmann und Pugh, 1986).

Ist der Ausstrich angefertigt, sollte er direkt mit handelsüblichen Sprays oder in einem Äther-Alkohol-Gemisch (1:1) fixiert werden. Ein einfaches Trocknen an der Luft führt zu Zelldeformationen (Couto und Hughes, 1984). Zur Färbung der Zytologien sind verschiedene Methoden etabliert. Für den einfachen praktischen Gebrauch hat sich die Diff-Quick®-Methode bewährt. Sie ist schnell durchführbar und eine Zelldifferenzierung ist gut möglich (Brook, 1992; Walter et al., 2006). Sano's Modifikation der Pollack's Trichrome Methode hat sich ebenfalls bewährt (Freeman et al., 1986). Sie gibt mehr Aufschluss über die zellulären Strukturen (Wingfield Digby, 1978; Freeman et al., 1986), dauert jedoch annähernd 40 Minuten, weswegen sie sich in der Praxis nicht durchgesetzt hat. Das von Pundel modifizierte Verfahren nach Shorr (Pundel und Lichtfus, 1957) wurde von Tillmann und Meinecke (1980) ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Eine zusätzliche Gram-Färbung auf einem zweiten Objektträger hat sich als nützlich erwiesen, um Bakterien und Pilze nachzuweisen (Pohl et al., 1977; Shin et al., 1979; Dascanio, 2003). Durch die Differenzierung zwischen gram-negativen und gram-positiven Keimen wird ein Beginn der antibiotischen Behandlung ermöglicht, bevor die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung vorliegen (Dascanio, 2003). Bei Verdacht auf eine Infektion mit Klebsiellen findet gelegentlich die Methylenblau-Färbung Anwendung, um die typische Bakterienkapsel nachzuweisen (Platt et al., 1976).

Epithelzellen sind die häufigsten Zellen im endometrialen Abstrich. Zeitweise, besonders im Diöstrus, weisen die Endometriumzellen Zilien auf (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003). Ihre Form reicht von einer kubischen im Anöstrus, bis hin zu grossen säulenartigen Zellen bei zyklischen Stuten (Brook, 1983; Freeman et al., 1986). Die Endometriumzellen von anöstrischen Stuten weisen eine geringe zytoplasmatische Vakuolisierung auf und es haftet kaum Schleim an (Liu, 1988). Im Diöstrus liegen die Zellen vermehrt in Gruppen zusammen, im Östrus sind sie separiert voneinander vorzufinden (Dascanio, 2003).

Degenerative Veränderungen an den Epithelzellen sind häufig auf eine schlechte Fixation oder Lufttrocknung zurückzuführen. Zellkerne ohne Zytoplasma sind als Artefakt des Ausstreichens zu interpretieren und kommen relativ häufig vor. Solomon (1972) brachte diese degenerativen Veränderungen mit einer verminderten Fertilität in Zusammenhang, was jedoch durch Brook (1992) nicht bestätigt werden konnte.

Das Vorhandensein einer Entzündung wird durch die Präsenz von Entzündungszellen, in erster Linie von neutrophilen Granulozyten, diagnostizierbar. In der Literatur werden verschiedene Richtlinien für die Interpretation des Nachweises von neutrophilen Granulozyten beschrieben (Tabelle 2). Eine Methode ist die Zählung der Entzündungszellen pro Gesichtsfeld im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung. Bei einem entzündeten Endometrium wären nach der aktuellen Literatur mehr als fünf Entzündungszellen in zehn Gesichtsfeldern zu detektieren, beziehungsweise ein Verhältnis von Endometriumzellen zu neutrophilen Granulozyten von unter 40 : 1 (Dascanio, 2003).

Die Morphologie der neutrophilen Granulozyten gibt Hinweise darauf, ob es sich bei der Entzündung um eine septische oder aseptische Inflammation handelt. Bei aseptischen Entzündungen im Rahmen von intrauterinen Behandlungen, Bedeckungen oder Besamungen finden sich intakte, segmentierte neutrophile Granulozyten. Bei einer septischen Inflammation zeigen die neutrophilen Granulozyten Phänomene wie Karyolyse, Karyorrhesis oder Pyknose (La Cour und Sprinkle, 1985).

Post partum finden sich erhöhte Dichten neutrophiler Granulozyten in den Endometriumszytologien, die jedoch bis zum ersten Östrus stetig abnehmen und dann auf basalem Niveau verbleiben. Die Zellnekrose steigt zum ersten Östrus *post partum* sowohl bei den neutrophilen Granulozyten und bei den epithelialen Zellen an. Dies ist ein Indiz für eine rasch einsetzende Zellerneuerung unmittelbar *post partum* (Saltiel et al., 1987).

Ausser den neutrophilen Granulozyten sind selten auch Makrophagen, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten zu detektieren.

Makrophagen finden sich vor allem bei Stuten in der Fohlenrosse (La Cour und Sprinkle, 1985). Sie kommen üblicherweise mit Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten zusammen vor. Sie sind oft mehrkernig und weisen Vakuolen auf (Brook, 1992). Lymphozyten finden sich selten im endometrialen Abstrich (Wingfield Digby, 1978). Sie werden im Zusammenhang mit chronischen Endometritiden und bei einer Lymphstauung des Endometriums beschrieben.

Eosinophile Granulozyten lassen sich äusserst selten nachweisen. Meist findet man sie bei Stuten mit einer Pneumovagina, die vermutlich auch zu einem Pneumouterus führt. Nach Insufflation von Luft in die Gebärmutter konnten in den Endometriumszytologien vermehrt eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden (Slusher et al., 1984).

Erythrozyten finden sich in erster Linie in den Abstrichen von Stuten *post partum* sowie in Fällen von akuten Endometritiden. Sie können bei ansonsten unauffälligen Stuten auch durch ein Trauma während der Entnahme im Ausstrich nachzuweisen sein (Wingfield Digby, 1978).

Tabelle 2 gibt die Beurteilungsmöglichkeiten der Endometriumszytologien nach verschiedenen Autoren wieder.

Tabelle 2: Beurteilungsmöglichkeiten für Endometriumszytologien nach verschiedenen Autoren (GF = Gesichtsfeld) (modifiziert nach Brook, 1992).

Autor	Methode der Quantifizierung			
Knudsen, 1964	Positiv bei > 1 neutrophilen Granulozyten in 5 Gesichtsfeldern (x 240)			
Lauer, 1977	Grad 1	+/-	1-5	neutroph. Granulozyten in 10 GF
	Grad 2	+	1	neutroph. Granulozyt pro GF
	Grad 3	++	2-10	neutroph. Granulozyten pro GF
	Grad 4	+++	10-30	neutroph. Granulozyten pro GF
	Grad 5	++++	> 30	neutroph. Granulozyten pro GF
Wingfield-Digby, 1978	≥ 1 neutroph. Granulozyt pro Ausstrich ist positiv			

Autor	Methode der Quantifizierung		
Asbury, 1982	Positiv: Endometriumszellen : neutrophilen Granulozyten > 10 : 1		
Couto und Hughes, 1985	-	0–3 %	neutrophile Granulozyten
	+	3–10 %	neutrophile Granulozyten
	++	10–15 %	neutrophile Granulozyten
	+++	15–30 %	neutrophile Granulozyten
	++++	30–50 %	neutrophile Granulozyten
	+++++	50–75 %	neutrophile Granulozyten
	++++++	> 75 %	neutrophile Granulozyten
Brook, 1985	Negativ:		
	kein neutrophiler Granulozyt pro 10 GF (x 400)		
	Zweifelhaft:		
	1-5 neutrophile Granulozyten pro 10 GF		
La Cour und Sprinkle, 1986	Positiv:		
	5 neutrophile Granulozyten pro 10 GF		
	Kategorie 0:		
	mittlere bis grosse Klumpen an Endometriumszellen mit wenig Zelltrümmern und anderen Zelltypen		
	Kategorie 1:		
	viele Klumpen an Endometriumszellen sowie teilweise Schleim, Zelltrümmer und mononukleäre Zellen		
	Kategorie 2:		
	weniger und kleinere Klumpen von Endometriumszellen, grössere Anteile an Zelltrümmern und weit zerstreute neutrophile Granulozyten (≤ 1 /GF) und Erythrozyten		

Autor	Methode der Quantifizierung		
LaCour und Sprinkle, 1986	Kategorie 3: entweder nur wenige morphologisch unauffällige Endometriumszellen und dafür viele Zelltrümmer, Erythrozyten und/oder Makrophagen, oder einige (2 bis 3 /GF) neutrophile Granulozyten unter den normalen Endometriumszellen		
	Kategorie 4: viele neutrophile Granulozyten (>3 /GF) sowie Endometriumszellen, Trümmer und Erythrozyten		
	Kategorie 5: Ausstriche, die gänzlich aus neutrophilen Granulozyten bestehen, meist mit degenerierten neutrophilen Granulozyten		
Ball et al., 1988	Positiv wenn > 2 % der Zellen neutrophile Granulozyten sind		
Purswell et al., 1989	Positiv bei ≥ 1 neutrophiler Granulozyt pro GF (x 400)		
Ricketts und Mackintosh, 1989	-	0 %	neutrophile Granulozyten
	+/-	< 0,5 %	neutrophile Granulozyten
	+	0,5 - 5 %	neutrophile Granulozyten
	++	30 %	neutrophile Granulozyten
	+++	> 30 %	neutrophile Granulozyten
Dascanio, 2003	Positiv bei > 5 neutrophilen Granulozyten pro 10 GF (x 400), oder einem Verhältnis von Endometriumszellen zu neutrophilen Granulozyten von < 40 : 1		

3 Material und Methode

3.1 Probanden

Insgesamt wurden 26 Stuten, im Fühjahr 2004 auf dem Gießener Schlachthof im ingraviden Stadium geschlachtet, in die Studie aufgenommen. Keines der Tiere zeigte vor der Schlachtung eine Störung des Allgemeinbefindens. Das Alter der Stuten lag zwischen 5 und 30 Jahren (Durchschnitt 16,9 Jahre), die Rassezugehörigkeit war unterschiedlich (Tabelle 3). Zur Bestimmung eines Differentialblutbildes und der Hormonkonzentrationen von Progesteron und Östradiol-17 β wurden bei allen Stuten zwei venöse Blutproben entnommen. Das Blut wurde im Anschluss an die Betäubung, nach Anschneiden der *Vena jugularis*, mit einem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und einem Lithium-Heparin beschichteten Blutröhrchen aufgefangen.

In die histologische Untersuchung aufgenommen wurden nur Tiere, die zum Zeitpunkt der Schlachtung genitalgesund waren und sich eindeutig einem Zyklusstadium zuordnen liessen (s. 3.4). Die Kontrolle auf Geschlechtsgesundheit wurde anhand des Vorberichtes und der makroskopischen Beurteilung der Geschlechtsorgane nach der Schlachtung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Entnahme exfoliativer Zytologien des Endometriums und der Zervix.

Die zyklische Einordnung erfolgte nach makroskopischen Befunden und den Hormonkonzentrationen.

Als Ausschlusskriterium für die zytologische Untersuchung galt:

- abnorme Füllung im Uterus

Als Ausschlusskriterien für die histologische Untersuchung galten:

- Nachweis von entzündlichen Veränderungen in der Zytologie
- Endometriumszysten
- Lebensalter \geq 30 Jahre
- Hormonkonzentrationen, die nicht einem physiologischen Zyklusstadium entsprechen

An den Geschlechtsorganen wurden folgende Parameter erfasst:

- Zahl und Grösse der Funktionsgebilde auf den Ovarien
- Ödematisierung des Endometriums

Die Grössen der Funktionsgebilde wurden mit einer handelsüblichen Schublehre vermessen.

3.2 Hämatologische Untersuchung

Innerhalb von vier Stunden nach der Schlachtung erfolgte die Bestimmung des Differentialblutbildes mit dem Cell-Dyn[®] 3500 im Labor der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Leukozytenkonzentration wird bei diesem Gerät im Impedanzmesskanal nach dem Prinzip der elektrischen Widerstandsmessung bestimmt. Die optische Differenzierung der Leukozyten erfolgt mittels eines flow-zytometrischen Verfahrens nach Präparation der Zellen im vertikal polarisierten Licht eines Helium-Neon Lasers. Die Interaktion von Leukozyten und Laser resultiert in einer messbaren, für jede Zellklasse spezifischen Streuintensität. Die Transformation dieser optischen Signale in elektrische Impulse ergibt Informationen über zytomorphologische Details, die eine Bewertung und Zuordnung der Leukozyten erlaubt.

Insbesondere die Zahl eosinophiler Granulozyten im Blut fand Berücksichtigung. Als Referenzwert galten $40 - 350 \times 10^6$ eosinophile Granulozyten /l (Kraft et al., 2005).

3.3 Endokrinologische Untersuchung

Zur Hormonanalyse wurde das Plasma innerhalb von vier Stunden nach der Schlachtung abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Die Bestimmung der Konzentrationen von Östradiol-17 β und Progesteron mittels Radioimmunoassays wurde durch das Personal des hormonanalytischen Labors der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher

Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Für die Bestimmung von Östradiol-17 β und Progesteron wurden im Labor etablierte Verfahren angewandt (Hoffmann et al., 1973; Hoffmann et al., 1992).

Bei der Progesteronbestimmung lag der Intraassayvariationskoeffizient zwischen 8,8 % und 9,6 %, der Interassayvariationskoeffizient zwischen 8,9 % und 11,3 %. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng/ml (0,318 nmol/l).

Bei der Bestimmung von Östradiol-17 β lag der Intraassayvariationskoeffizient zwischen 6,0 % und 11,4 %, der Interassayvariationskoeffizient zwischen 13,1 % und 13,2 %. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,4 pg/ml (1,47 pmol/ml).

3.4 Zuordnung der Stuten in die Zyklusstadien

Die Einteilung der Stuten in die verschiedenen Zyklusstadien erfolgte anhand der Hormonkonzentrationen, unter Berücksichtigung der makroskopischen Befunde.

Als östrisch zählten Stuten, die neben einem Follikel von über 3 cm im Diameter eine Ödematisierung des Uterus aufwiesen (Handler und Aurich, 2005).

Die Grenzwerte für die hormonelle Zyklusansprache wurden wie folgt festgelegt (Ginther, 1992 c; Davies Morel, 2003; Meyer-Scheel, 2005):

Östrus:	Östradiol-17 β :	> 10	pg/ml (36,6 pmol/l) und
	Progesteron:	< 1	ng/ml (3,2 nmol/l)

Diöstrus:	Östradiol-17 β :	< 10	pg/ml (36,6 pmol/l) und
	Progesteron:	> 1	ng/ml (3,2 nmol/l)

Anöstrus:	Östradiol-17 β :	< 10	pg/ml (36,6 pmol/l) und
	Progesteron:	< 1	ng/ml (3,2 nmol/l)

Stuten, die sich anhand der makroskopischen Befunde und des Hormonstatus nicht eindeutig in ein Zyklusstadium einordnen liessen, fanden in der histologischen Untersuchung keine Berücksichtigung.

Die Probanden mit ihrer zyklischen Einordnung sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zyklische Einordnung der Stuten, welche für die Untersuchung zur Verfügung standen (AÖ = Anöstrus; Ö = Östrus; DÖ = Diöstrus; ID = Indifferent; C.h. = *Corpus haemorrhagicum*; C.l. = *Corpus luteum*; FD = Follikeldurchmesser; ödem. = ödematisiert; - = nicht ödematisiert).

Stute Nr.	Alter (Jahre)	Rasse	Funktionsgebilde auf den Ovarien	Uterus	Östradiol- (17 β pg/ml)	Progesteron (ng/ml)	Zyklusstand
1	15	Warmblut	FD: 2,5 cm	–	8,8	0,20	AÖ
2	27	Warmblut	FD: 1,5 cm	–	20,40	7,14	ID
3	27	Kaltblut	FD: 3 cm	ödem.	10,8	0,28	Ö
4	11	Warmblut	FD: 5 cm	ödem.	25,2	0,58	Ö
5	13	Warmblut	FD: < 2cm	–	9,6	0,46	AÖ
6	30	Haflinger	keine	–	2,4	<0,1	AÖ
7	9	Warmblut	FD: 5 cm	–	11,6	5,3	ID
8	27	Warmblut	FD: 2 cm	–	3,2	6,90	DÖ
9	24	Warmblut	FD: 3,5 cm	–	11,2	3,3	ID
10	13	Warmblut	FD: 4 cm	–	6,8	9,00	DÖ
11	24	Warmblut	FD: 4 cm	–	13,6	11,50	ID
12	11	Warmblut	FD: 3,5 cm	ödem.	<2,0	3,63	DÖ
13	19	Reitpony	FD: < 2 cm	–	2,8	11,77	DÖ

- Fortsetzung Tabelle 3 -

Stute	Alter (Jahre)	Rasse	Funktions- gebilde am Ovar	Uterus	Östradiol- 17 β pg/ml	Progesteron ng/ml	Zyklus- stand
14	10	Haflinger	FD: 3,5 cm	ödem.	7,6	0,42	AÖ
15	16	Vollblut	FD: 3 cm	–	<2,0	<0,10	AÖ
16	12	Warmblut	FD: 4 cm und 4,5 cm	–	2,8	3,99	DÖ
17	26	Warmblut	keine	–	<2,0	<0,10	AÖ
18	21	Warmblut	C. l.	–	3,2	16,50	DÖ
19	11	Warmblut	FD: 2,5cm	–	29,6	3,50	ID
20	12	Warmblut	FD: 3,5 cm	–	2,4	0,30	AÖ
21	15	Warmblut	FD: 3,5 cm	–	6,0	15,80	DÖ
22	12	Haflinger	FD: 4,5 cm	–	7,6	0,72	AÖ
23	20	Warmblut	FD: 3,5 cm	–	3,6	0,3	AÖ
24	24	Warmblut	FD: 5 cm	ödem.	8,4	0,50	AÖ
25	5	Warmblut	FD: 2,5 cm & 2 C. h.	ödem.	6,8	11,40	DÖ
26	6	Warmblut	FD: 4 cm	ödem.	2,8	4,20	DÖ

3.5 Materialgewinnung

Den Tieren wurde direkt nach der Betäubung durch den Bolzenschuss beim Entbluten das Blut für die Hormonbestimmungen (Lithium-Heparin) und das Blutbild (EDTA) entnommen. Während des routinemässigen Zerlegungsvorganges erfolgte etwa 20 Minuten nach der Betäubung die Entnahme des kompletten Genitaltraktes sowie eines 3 x 3 x 3 cm grossen Gewebestückes aus Leber, Milz und Dünndarm. Die Untersuchung somatischer Organe war notwendig, um zu überprüfen, in welchen Parenchymen regelmässig eosinophile Granulozyten und Mastzellen dargestellt werden können. Dieser Arbeitsschritt diente der Gewinnung von Kontrollproben, um die spezifischen Anfärbungen von eosinophilen Granulozyten mittels Sirius-Red-Färbung sowie der Mastzellen mittels Toluidin-Blau-Färbung in den Geschlechtsorganen zu verifizieren.

Es wurden die oben erwähnten Ovarbefunde erhoben. Im Anschluss daran erfolgte die Längseröffnung des *Corpus uteri*, der Zervix und der Vagina an ihrer Dorsalseite. Eine Untersuchung des Genitaltraktes auf makroskopisch erkennbare, pathologische Abweichungen wurde bei jeder Stute durchgeführt.

Die Entnahme der exfoliativen Zytologien erfolgte wie in 3.6 beschrieben. Aus dem *Corpus uteri* und aus der Vagina wurde je ein zirka 3 x 3 x 3 cm grosses Gewebestück entnommen und die Zervix komplett herausgetrennt. Nach Abspülen des Blutes mit Phosphatpuffer konnten die Proben zum Transport in einen 0,1 M Natriumphosphatpuffer überführt werden, um anschliessend in Formol nach Lillie fixiert zu werden.

3.6 Exfoliative Zytologien

Die exfoliativen Zytologien wurden mittels eines Wattetupfers nach dem Eröffnen des Geschlechtstraktes aus dem *Corpus uteri* sowie aus dem *Canalis cervicalis* entnommen und auf je einem Objektträger ausgestrichen. Die Fixation der Abstriche in Äther-Alkohol (1:1) erfolgte unmittelbar nach der Entnahme für 30 Minuten. Zum Färben der Präparate wurde, nach Lauer (1977), die Papanicolaou-Shorr-Färbung gewählt. Acidophile Zellen erscheinen in dieser Färbung orange-rot, basophile Zellen sind blau gefärbt (Abbildung 4).

Papanicolaou-Shorr-Färbung:

Absteigende Alkoholreihe:	Ethanol absolut - Ethanol 80 % - Ethanol 70 % - Ethanol 50 % - <i>Aqua destillata</i> : je 15 min
Färbung mit Hämatoxylin:	=> 6 Minuten färben
Leitungswasser:	=> schlierenfrei spülen
Ammoniak-Alkohol:	=> 1 Minute färben
Shorr-Färbelösung:	=> 2 Minuten färben
Aufsteigende Alkoholreihe:	Ethanol 50 % - Ethanol 70 % - Ethanol 80 % - Ethanol absolut: je 15 min

Die gefärbten Ausstriche wurden getrocknet und zur Aufbewahrung mit Roti®-Histokitt eingedeckelt.

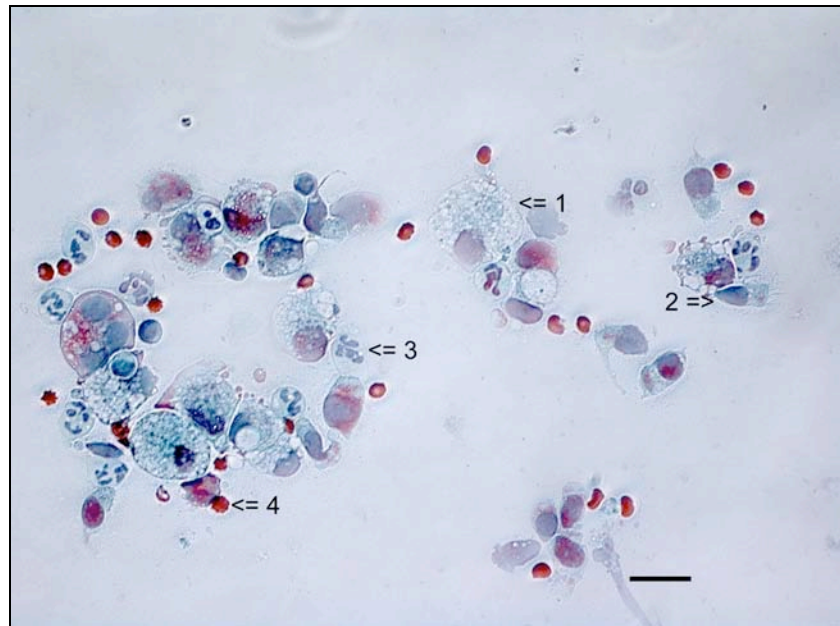


Abbildung 4: Exfoliative Zervikalzytologie der Stute 23 mit Zervizitis, Färbung Papanicolaou-Shorr, 1 = Endometriumszelle, 2 = Zervikalzelle, 3 = neutrophiler Granulozyt, 4 = Erythrozyt (Balkenlänge 20 µm).

Die Beurteilung der Ausstriche erfolgte nach Lauer (1977). Es wurde das Vorkommen von neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld dokumentiert. Die Einteilung staffelte sich folgendermassen:

1 – 5	neutrophile Granulozyten in 10 Gesichtsfeldern:	±
1	neutrophiler Granulozyt pro Gesichtsfeld:	+
2 – 10	neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld:	++
11 - 30	neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld:	+++
> 30	neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld:	++++

Bei Tieren, in deren Ausstrichen ein oder mehr neutrophile Granulozyten gefunden wurden, fand keine histologische Auswertung statt.

3.7 Aufarbeitung der Gewebeproben

Zuerst fand eine Fixation der Gewebe in Formol nach Lillie über 72 Stunden bei 4°C statt. Die Einteilung der Zervix in fünf Regionen (R1 - R5) erfolgte analog zu Huchzermeyer (2003) von cranial nach caudal (Abbildung 5). Es wurde die Gesamtlänge der Zervix ermittelt und in fünf gleich grosse Regionen aufgeteilt. Aus jeder Region (R1 = cranial bis R5 = caudal) wurde ein Gewebeblock von 0,5 x 0,5 x 1 cm präpariert. Als Kontrollorgane dienten Uterus, Vagina, Leber, Milz und Darm, aus deren vorfixierten Proben ebenfalls je ein 0,5 x 0,5 x 1 cm grosser Block präpariert wurde. Die Gewebe konnten nun in Histologie-Käfige eingebracht werden. Es folgte eine weitere Periode der Fixation in Formol nach Lillie über 24 Stunden. Bis zum Einbetten lagerten die Käfige mit den Geweben in 0,1 M Natriumphosphatpuffer bei 4°C.

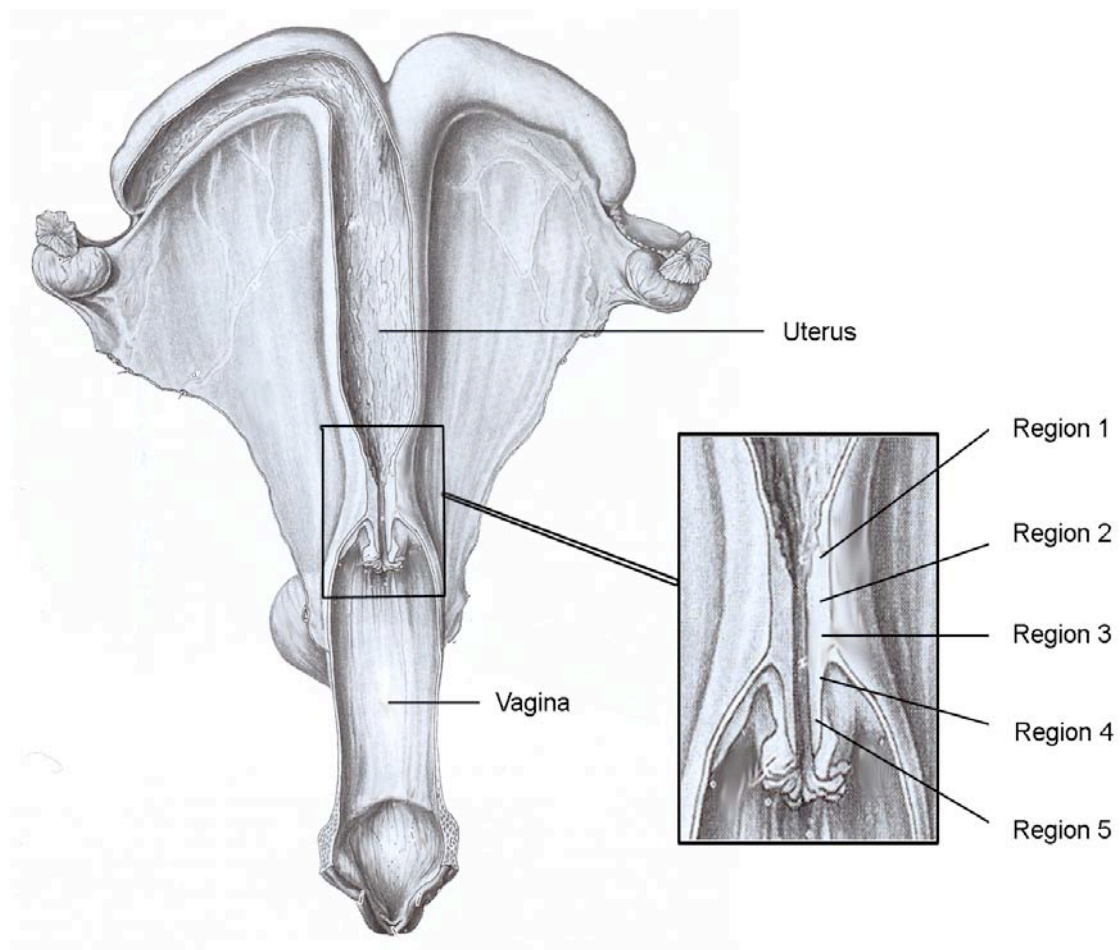


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Probenentnahmestellen im Genitaltrakt der Stute, modifiziert nach Leiser (1999).

Im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen schloss sich die Einbettung in Paraffin mit dem Microm Einbettautomaten an.

Einbettung

Aufsteigende Alkoholreihe:	Isopropanol 70 %, Isopropanol 80 %, Isopropanol 96 %, Isopropanol 100 %, Isopropanol 100 % je 15 Minuten bei Raumtemperatur
Xylol:	Zweimal 15 Minuten bei Raumtemperatur
Paraffin:	Dreimal 15 Minuten bei 60°C

Die Anfertigung der 7 µm dicken Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines Mikrotomes. Dem Schneiden ging eine kurze Kühlung der Schnittfläche auf Eis voran, um das Anfertigen der Schnitte zu erleichtern.

In das Mikrotom waren Einmalklingen eingespannt. Um die Schnitte zu glätten und auf einen Objektträger aufziehen zu können, wurden sie in ein 35 - 38°C warmes Bad mit *Aqua destillata* gelegt. Die zum Aufziehen der Schnitte verwandten Objektträger waren mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtet. Die Beschichtung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

APES-Beschichtung

APES:	20 Sekunden in 2 % ige Lösung
Aceton reinst:	Zweimal spülen
<i>Aqua destillata</i> :	Zweimal spülen

Die Objektträger wurden getrocknet und in geschlossenen Gefäßen bei Raumtemperatur bis zur Färbung gelagert.

3.8 Färbung der Gewebeschnitte

Verschiedene Färbungen fanden für die histologische Untersuchung der Gewebe Anwendung. Zuerst wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Übersichtsdarstellung durchgeführt (Romeis, 1989). Zur Anfärbung der eosinophilen Granulozyten fand die Sirius-Red-Färbung Anwendung (Wehrend et al., 2004b). Desweiteren folgte eine Färbung mit Toluidin-Blau zur Darstellung der Mastzellen (Huchzermeyer, 2003). Im Folgenden sind die den Färbungen zugrunde liegenden Protokolle aufgeführt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Rotihistol:	Zweimal 15 Minuten
Absteigende Alkoholreihe:	Ethanol absolut, Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Ethanol 60 %, Ethanol 50 % jeweils 5 Minuten
<i>Aqua destillata</i> :	5 Minuten
Hämatoxylin:	1,5 Minuten
Leitungswasser:	15 Minuten wässern
Eosin 1 %:	4 Minuten
<i>Aqua destillata</i> :	3 x tauchen
Ethanol 70 %:	1 x tauchen
Ethanol 80 %:	2 Minuten
Ethanol 96 %:	30 Sekunden
Rotihistol:	Zweimal 10 Minuten

Sirius-Red-Färbung

Rotihistol:	Zweimal 15 Minuten
Absteigende Alkoholreihe:	Ethanol absolut, Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Ethanol 60 %, Ethanol 50 % jeweils 5 Minuten
<i>Aqua destillata</i> :	5 Minuten
Hämatoxylin:	1 x tauchen
Leitungswasser:	Wässern bis leicht bläulich
Ethanol 70 %:	3 x tauchen
Sirius-Red-Lösung:	24 Stunden
<i>Aqua destillata</i> :	10 Minuten spülen
Ethanol 70 %:	1 x tauchen
Ethanol 80 %:	2 Minuten
Ethanol 96 %:	30 Sekunden
Rotihistol:	Zweimal 10 Minuten

Toluidin-Blau-Färbung

Rotihistol:	Zweimal 15 Minuten
Absteigende Alkoholreihe:	Ethanol absolut, Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Ethanol 60 %, Ethanol 50 % jeweils 5 Minuten
<i>Aqua destillata</i> :	Zweimal 2 Minuten
Toluidin-Blau 0,003 %:	60 Minuten
<i>Aqua destillata</i> :	10 Minuten spülen
Ethanol 70 %:	1 x tauchen
Ethanol 80 %:	2 Minuten
Ethanol 96 %:	30 Sekunden
Rotihistol:	Zweimal 10 Minuten

Unmittelbar nach der Färbung erfolgte das Eindeckeln mit Roti®-Histokitt.

3.9 Lichtmikroskopische Auswertung der exfoliativen Zytologien

Zur Auswertung der endometrialen und zervikalen Zytologien standen Proben von insgesamt 26 Tieren zur Verfügung. Darunter befanden sich fünf Tiere, die für die histologische Untersuchung nicht alle Einschlusskriterien erfüllten.

Es wurden je Ausstrich sieben Gesichtsfelder in 400 facher Vergrößerung hinsichtlich folgender Parameter ausgezählt:

- Gesamtzellzahl
- Neutrophile Granulozytenzahl
- Erythrozytenzahl
- Anzahl an Endometriums- und Zervikalzellen
- Vorkommen von Schleim

Diese Auswertung erfolgte sowohl in den zervikalen als auch in den endometrialen Ausstrichen. Aus den jeweils sieben ausgezählten Gesichtsfeldern wurde der arithmetische Mittelwert berechnet. Anhand der Gesamtzellzahl und der Zahl neutrophiler Granulozyten erfolgte die Berechnung der Neutrophilen-Index (Quotient aus der Anzahl neutrophiler Granulozyten durch die Anzahl der Gesamtzellen).

3.10 Lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte

Zunächst wurden die Schnitte hinsichtlich Intaktheit, Färbung und Darstellung der typischen Gewebetextur der einzelnen Organe kontrolliert. Schnitte, welche in den aufgeführten Kriterien nicht den Anforderungen entsprachen, fanden keine Berücksichtigung.

Zur Auswertung herangezogen wurden in jeder der drei Färbungen jeweils drei Schnitte aller fünf Zervixregionen (R1 bis R5) und in jeder der drei Färbungen jeweils zwei Schnitte der Kontrollorgane Vagina, Uterus, Milz, Leber und Darm. Die histologische Untersuchung erfolgte mittels eines Lichtmikroskopes, welches an eine Digitalkamera angeschlossen war. Diese übertrug zeitgleich die Bilder auf einen Computer, auf dem sich die Bildausschnitte speichern und dokumentieren liessen. Mit Hilfe eines Bildanalyseprogrammes konnten die Parameter erhoben und

ausgewertet werden. Zur Auswertung kamen zehn Gesichtsfelder pro Schnitt, so dass pro Färbung von jeder Zervix-Region 30 Gesichtsfelder und von jedem Kontrollorgan 20 Gesichtsfelder je Stute ausgewertet wurden. Das Zählen der Zellen und Berechnen der Flächen erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes. Zur Ermittlung der Zelldichten in der Gesamtzervix wurden die Dichten aus den fünf Einzelregionen addiert.

3.11 Statistische Methoden

Die statistische Bearbeitung der Daten erfolgte im Hochschulrechenzentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Verwendung des Statistik-Programmes SPSS Version 12.0.1.

Zur Deskription der Daten wurde der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung sowie der Median berechnet. Die Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung erfolgte in der Regel bis auf zwei Stellen hinter dem Komma. In den Fällen, in denen die erste Stelle nach dem Komma eine Null darstellte wurden mindestens drei Kommastellen angegeben. Bei den statistischen Analysen erfolgte die Berechnung der zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit. Ein p-Wert von kleiner gleich 0,05 galt als statistisch signifikant. Zur Beantwortung der unterschiedlichen Fragestellungen wurden differente statistische Tests herangezogen (Tabelle 4).

Bei allen Parametern, bei denen im Rahmen der zytologischen Untersuchung eine potenzielle Beeinflussung durch die Steroidhormone untersucht wurde, erfolgte eine Berücksichtigung von nur 21 Stuten. Dies liegt in den gemessenen Hormonkonzentrationen begründet, die bei den fünf ausgeschlossenen Tieren nicht mit einem physiologischen Zyklusstadium in Zusammenhang gebracht werden konnten (siehe 3.4). Für die histologischen Untersuchungen standen die Ergebnisse von 19 Stuten zur Verfügung. Die Reduktion von 26 auf 19 liegt in den nicht erfüllten Einschlusskriterien von sieben Stuten begründet (siehe 3.1).

Der Mann-Whitney-Test fand in den Fällen Anwendung, in denen es darum ging, eine potenzielle Beeinflussung der entsprechenden Parameter durch die Zuteilung in eine Zyklusphase zu analysieren. Bei diesen Berechnungen ist zu beachten, dass sich in der Gruppe der östrischen Tiere nur zwei Pferde befanden. Eine Korrektur auf Mehrfachvergleiche wurde nicht durchgeführt.

Tabelle 4: Angewandte statistische Verfahren zur Analyse der zytologischen und histologischen Ergebnisse.

	Korrelation zwischen		Statistisches Verfahren
	Parameter 1	Parameter 2	
Zytologische Untersuchungen	Gesamtzellzahl, neutrophile Granulozytenzahl, Neutrophilen-Index in Zervikal- und Endometriumszytologien	Östradiol-17 β , Progesteron, Östradiol/ Progesteron-Quotient	Korrelationskoeffizient nach Spearman
	Gesamtzellzahl und neutrophile Granulozytenzahl in Zervikalzytologien	Gesamtzellzahl und neutrophile Granulozytenzahl in Endometriumszytologien	Korrelationskoeffizient nach Spearman
Histologische Untersuchungen	Eosinophile Granulozyten und Mastzellen	Zervixregionen R1 - R5	Friedman-Test
	Eosinophile Granulozyten und Mastzellen	Vagina, Zervix, Uterus	Korrelationskoeffizient nach Spearman
	Eosinophile Granulozyten und Mastzellen	Östradiol-17 β , Progesteron, Östradiol/ Progesteron-Quotient	Korrelationskoeffizient nach Spearman
	Mastzellen in Vagina, Zervix und Uterus	Eosinophile Granulozyten in Vagina, Zervix und Uterus	Korrelationskoeffizient nach Spearman
	Eosinophile Granulozyten und Mastzellen in den Genitalorganen	Zyklusstadium	Mann-Whitney-Test

4 Ergebnisse

4.1 Zyklusdiagnostik

Von den 26 Stuten wiesen 16 einen Follikel von ≥ 3 cm Durchmesser auf (61,5 %). Bei einer Stute konnten zwei *Corpora haemorrhagica* festgestellt werden (3,8 %), bei einer weiteren ein *Corpus luteum* mit einem Diameter von 1,8 cm (3,8 %). Sieben Stuten zeigten eine deutliche Ödematisierung des Uterus (26,9 %), sechs davon hatten zusätzlich einen Follikel von > 3 cm Durchmesser auf einem Ovar (85 %). Die siebte Stute mit ödematisiertem Uterus war das Tier mit den beiden *Corpora haemorrhagica*. Durch die Zusammenfassung der makroskopischen Ovar- und Uterusbefunde waren sechs Stuten dem Zyklusstand Östrus, acht dem Anöstrus und zwei dem Diöstrus zuzuordnen. Zehn Stuten liessen sich aufgrund der makroskopischen Beurteilung in kein Zyklusstadium einordnen.

Die Östradiol-17 β -Konzentrationen schwankten bei allen Tieren zwischen < 2 pg/ml und 29,6 pg/ml. Die Progesteronkonzentrationen lagen zwischen $< 0,1$ ng/ml und 16,5 ng/ml im Plasma. Zur Einordnung in die Zyklusstadien wurden die in 3.4 aufgeführten Richtwerte herangezogen.

Lediglich zwei der sechs makroskopisch östrisch eingestuften Stuten liessen sich auch anhand der Hormonanalysen eindeutig als östrisch einordnen. Die erste Stute im Östrus wies eine Plasma-Östradiol-17 β -Konzentration von 10,8 pg/ml bei einer Plasmaprogesteronkonzentration von 0,28 ng/ml auf. Bei der zweiten Stute lag die Östradiol-17 β -Konzentration mit 25,2 pg/ml noch deutlich höher, die Progesteronkonzentration lag bei 0,58 ng/ml.

Zehn Stuten fielen in die Gruppe der anöstrischen Tiere, da beide Hormonkonzentrationen auf Basalniveau lagen (Östradiol-17 β < 10 pg/ml und Progesteron < 1 ng/ml). Bei sechs der anöstrischen Stuten befanden sich auf den Ovarien Follikel zwischen 3 und 5 cm im Durchmesser. Bei einer dieser hormonell anöstrischen Stuten war neben einem Follikel von 5 cm Durchmesser auch eine Ödematisierung des Uterus festzustellen. Die vier weiteren anöstrischen Stuten wiesen weder an den Ovarien noch am Uterus Veränderungen auf, die auf eine Rosse hindeuteten.

Neun Stuten waren durch die Hormonanalysen eindeutig dem Zyklusstadium des Diöstrus zuzuordnen (Östradiol-17 β < 10 pg/ml, Progesteron > 1 ng/ml). Von diesen neun Tieren wiesen fünf einen Follikeldurchmesser von über 3 cm auf. Eine dieser fünf Stuten zeigte einen ödematisierten Uterus. Bei einer der neun diöstrischen Stuten konnten zwei *Corpora haemorrhagica* nachgewiesen werden sowie bei einer weiteren ein *Corpus luteum*. Zwei der hormonell als diöstrisch eingestuften Stuten wiesen keine Funktionsgebilde auf den Ovarien auf.

Fünf Stuten konnten anhand der Hormonanalysen keinem eindeutigen Zyklusstadium zugeordnet werden. Bei ihnen war sowohl die Östradiol-17 β - als auch die Progesteronkonzentration über Basalniveau.

Aus diesen Daten lässt sich schliessen, dass anhand der makroskopischen Befunde sechs Tiere östrisch waren, was sich jedoch nur bei zwei Tieren in den Hormonanalysen bestätigte (33 %). Der anöstrischen Gruppe konnten nach den Hormonanalysen zwei Stuten mehr zugeordnet werden (20 %) als dies mit den alleinigen makroskopischen Befunden möglich war. Von den neun diöstrischen Stuten waren nur zwei (22,2 %) anhand makroskopischer Befunde eindeutig zu identifizieren. Waren anhand der makroskopischen Befunde noch zehn Stuten keinem eindeutigen Zyklusstadium zuzuordnen, so konnte die Hälfte nach den Hormonanalysen noch eindeutig zugeordnet werden (Tabelle 5).

Insgesamt betrachtet stimmte bei elf Stuten die rein makroskopische Zykluseinordnung mit der zyklischen Klassifizierung durch die Hormonanalysen überein (42,3 %).

Tabelle 5: Einordnung der Stuten (n = 26) anhand makroskopischer und hormoneller Befunde in die Zyklusstadien. Angegeben sind die Stutenzahlen, die der entsprechenden Gruppe zugeordnet wurden.

	Östrus	Anöstrus	Diöstrus	Indifferent
Makroskopische Befunde	6	8	2	10
Östradiol-17β & Progesteron	2	10	9	5

4.2 Ergebnisse der exfoliativen Zervikalzytologien

Gesamtzellzahl

Insgesamt wurden von 26 Stuten Proben entnommen. Bei 18 dieser Tiere konnten in der Zervikalzytologie Zellen nachgewiesen werden (69 %). Bei all diesen Stuten liessen sich sowohl Zervikal- als auch Endometriumzellen detektieren.

Die Zervikalzellen waren aufgrund verschiedener morphologischer Besonderheiten von den Endometriumzellen zu differenzieren. Die Endometriumzellen wiesen einen runden, meist zentral liegenden Kern mit deutlichem Zytoplasmasaum auf. Sie waren tendenziell rund, zeigten jedoch auch Deformationen. Die zylindrischen Zellen der Endozervix wiesen hingegen einen basal liegenden Zellkern auf. Deutlich liessen sich die Flimmerzellen der Zervix mit ihrem apikalen Kinoziliensaum darstellen (Abbildung 6).

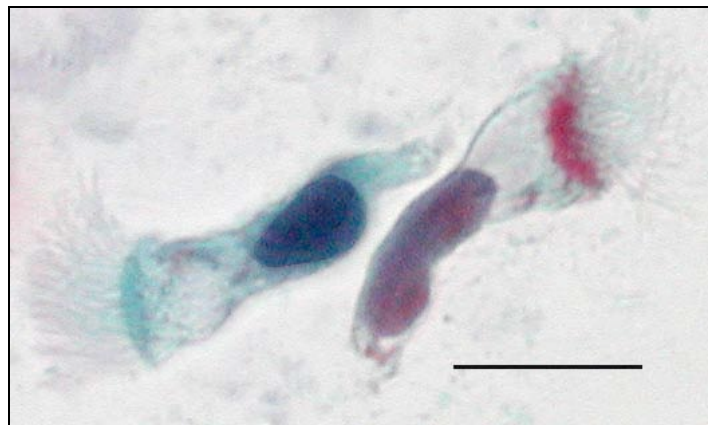


Abbildung 6: Zwei zervikale Flimmerzellen mit Kinozilien auf der apikalen Membran in einer exfoliativen Zervikalzytologie einer Stute, Papanicolaou-Shorr-Färbung (Balkenlänge 10 µm).

Die Zervikalzellen lagen solitär vor, so dass die typisch wabenförmige Struktur, wie sie bei der Dorsalansicht auf Zellverbände vorliegt, nicht beobachtet werden konnte. Gelegentlich liessen sich Zellen mit einem basal liegenden Kern sowie einem vakuolisierten Zytoplasma darstellen. Hier liegt die Vermutung nahe, dass es sich um sekretorisch aktive Zellen handelte.

Die durchschnittliche Gesamtzellzahl der 18 Stuten mit Zellausschluss lag bei $15,89 \pm 12,69$ Zellen (Median 13,70) pro Gesichtsfeld. Bezogen auf alle 26 Stuten ergab sich eine Zahl von $10,99 \pm 12,86$ (Median 9,50) Zellen pro Gesichtsfeld. Die durchschnittliche Anzahl an Endometriumszellen pro Gesichtsfeld bei den 18 Stuten mit Zellausschluss betrug $10,31 \pm 6,28$ (Median 10,35), im Vergleich zu durchschnittlich $2,28 \pm 2,84$ (Median 1,4) Zervikalzellen pro Gesichtsfeld. Bezogen auf alle 26 Stuten lag der Mittelwert der Endometriumszellen bei $7,14 \pm 7,10$ (Median 8,1) Zellen pro Gesichtsfeld. Zervikalzellen fanden sich hier nur in einer Dichte von $1,57 \pm 2,58$ (Median 0,75) Zellen pro Gesichtsfeld (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zellzahlen in den exfoliativen Zervikalzytologien (Zellen pro Gesichtsfeld) von Stuten (n = 26), angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median.

	Gesamtzellzahl	Endometriumszellen	Zervikalzellen
$\bar{x}_a \pm SA$	10,99 \pm 12,86	7,14 \pm 7,10	1,57 \pm 2,58
Median	9,50	8,10	0,75

Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der Gesamtzellzahl in den Zervikalzytologien und den peripheren Konzentrationen von Östradiol-17 β , Progesteron sowie dem Östradiol/Progesteron-Quotienten konnten nicht ermittelt werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Statistische Zusammenhänge zwischen den Gesamtzellzahlen in den exfoliativen Zervikalzytologien und den Hormonkonzentrationen von Östradiol-17 β und Progesteron (n = 21). Es lagen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge vor.

	Östradiol-17β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	-0,06	-0,13	0,03
p-Wert	0,79	0,59	0,89

Erythrozyten

Erythrozyten fanden sich in sieben Ausstrichen (26,9 %) der insgesamt 26 Proben.

Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten liessen sich aufgrund ihrer typischen Zellmorphologie zweifelsfrei ansprechen (Abbildung 7). Es handelte sich grösstenteils um Granulozyten mit segmentiertem Kern. Stabkernige neutrophile Granulozyten fanden sich nur vereinzelt. Die Zellmembran war meist sehr blass gefärbt, teilweise waren nur die Kerne darstellbar.

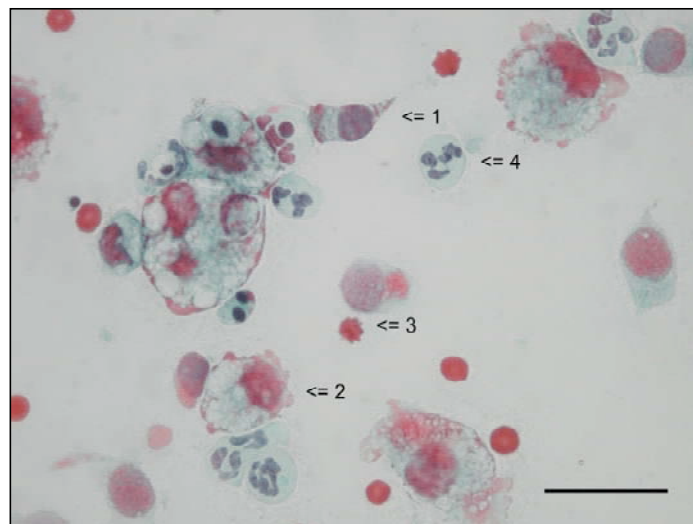


Abbildung 7: Exfoliative Zervikalzytologie einer Stute mit Nachweis von neutrophilen Granulozyten (1 = Zervikalzelle, 2 = Endometriumzelle, 3 = Erythrozyt, 4 = neutrophiler Granulozyt, Balkenlänge 25 μ m).

Bei fünf Stuten gelang der Nachweis von neutrophilen Granulozyten in der Zervikalzytologie. Dies entspricht einem Prozentsatz von 19,2 % bezogen auf die Gesamtgruppe (n = 26) und einem Prozentsatz von 27,7 % bezogen auf die Stuten mit Zellaufweis (n = 18). Vier dieser Stuten wiesen einen Zellgehalt neutrophiler Granulozyten von < 0,5 Zellen pro Gesichtsfeld auf (0,1 – 0,4).

Eine Stute zeigte mit 6,4 neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld deutliche inflammatorische Veränderungen. Das arithmetische Mittel der Zahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld bezogen auf alle Stuten ($n = 26$) lag bei $0,29 \pm 1,25$ (Median 0), bezogen auf die Stuten mit Granulozytennachweis ($n = 5$) lag es bei $1,5 \pm 2,7$ (Median 0,4) Zellen pro Gesichtsfeld.

Ein statistisch signifikanter Einfluss ($r = -0,47$; $p = 0,03$) auf die Zahl neutrophiler Granulozyten in der Zervikalzytologie konnte von der Plasma-Progesteronkonzentration nachgewiesen werden (Tabelle 8). Bei steigender Progesteronkonzentration nahm die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Zervikalzytologie ab (Abbildung 8).

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen der Zahl neutrophiler Granulozyten in den exfoliativen Zervikalzytologien von Stuten ($n = 21$) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. Die Abhängigkeit vom Progesteronwert war statistisch signifikant ($r = -0,47$; $p = 0,03$).

	Östradiol-17β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	-0,11	-0,47	0,32
p-Wert	0,63	0,03	0,16

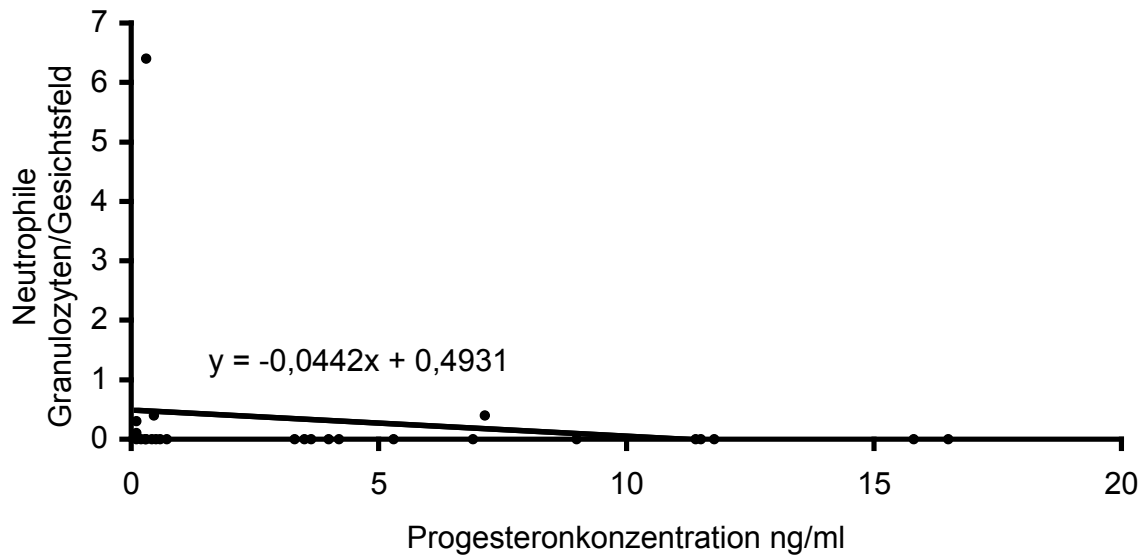


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen der Zahl neutrophiler Granulozyten in den exfoliativen Zervikalzytologien von Stuten (n = 21) und den Plasma-Progesteronkonzentrationen. Die Korrelation war statistisch signifikant ($r = -0,47$; $p = 0,03$).

Das arithmetische Mittel des Neutrophilen-Index aller Stuten (n = 26) lag bei $0,007 \pm 0,02$ (Median 0). Innerhalb der Stuten mit Zelnachweis (n = 18) lag er bei $0,04 \pm 0,05$ (Median 0,02).

Es liess sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($r = -0,48$; $p = 0,03$) zwischen der Progesteronkonzentration im Plasma und dem Neutrophilen-Index nachweisen (Tabelle 9). Bei steigendem Progesteron-Wert nahm die Dichte neutrophiler Granulozyten in den Zervikalzytologien ab (Abbildung 9).

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen dem Neutrophilen-Index in den exfoliativen Zervikalzytologien von Stuten (n = 21) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. Die Korrelation mit dem Progesteron-Wert war statistisch signifikant ($p = 0,03$).

	Östradiol-17 β	Progesteron	Östradiol/Progesteron-Quotient
Korrelationskoeffizient	-0,14	-0,48	0,32
p-Wert	0,55	0,03	0,16

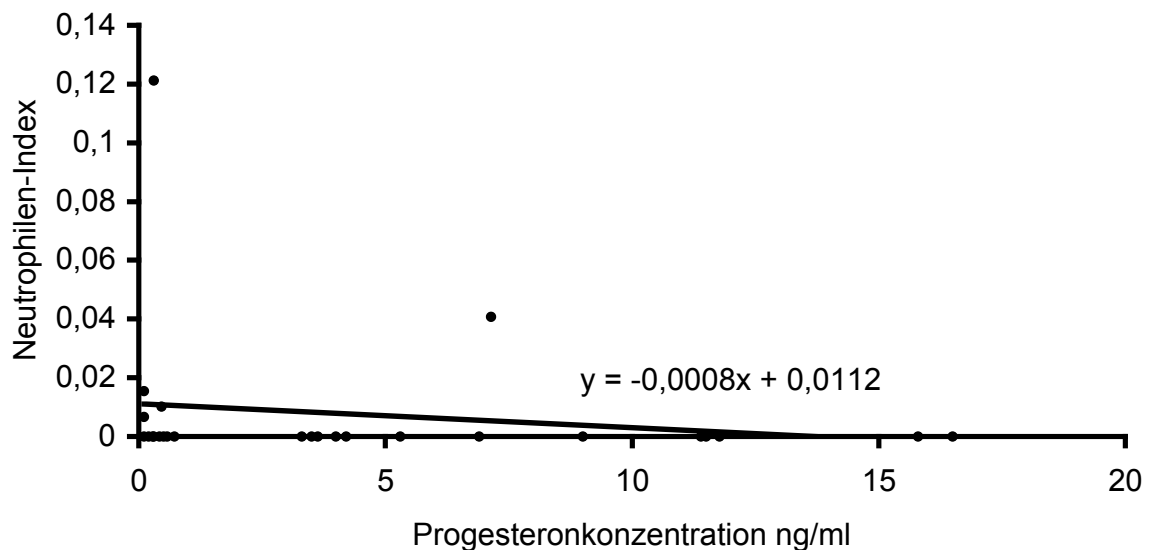


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen dem Neutrophilen-Index in den exfoliativen Zervikalzytologien von Stuten (n = 21) und der Plasmaprogesteronkonzentration. Die Korrelation war statistisch signifikant ($r = -0,48$; $p = 0,03$).

4.3 Ergebnisse der exfoliativen Endometriumszytologien

Gesamtzellzahl

Von 26 Stuten konnten bei 23 Tieren in den exfoliativen Endometriumszytologien Zellen nachgewiesen werden (88,5 %). Die durchschnittliche Gesamtzellzahl der 23 Stuten mit Zellenachweis lag bei $17,08 \pm 14,56$ (Median 11,7) Zellen pro Gesichtsfeld. Unter Einbeziehung aller 26 Stuten ergab sich eine durchschnittliche Zellzahl von $15,11 \pm 14,75$ (Median 11,15) Zellen pro Gesichtsfeld. In keiner der Endometriumszytologien wurden zervikale Zellen detektiert.

Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der Gesamtzellzahl und den peripheren Hormonkonzentrationen existierten nicht (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen den Gesamtzellzahlen in den exfoliativen Endometriumszytologien von Stuten (n = 21) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. Es lagen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge vor.

	Östradiol-17β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	0,17	0,08	0,03
p-Wert	0,46	0,73	0,88

Erythrozyten

Erythrozyten fanden sich in sieben Ausstrichen der insgesamt 26 Proben (26,9 %).

Neutrophile Granulozyten

Bei vier Stuten gelang der Nachweis von neutrophilen Granulozyten in der Endometriumszytologie, was einem Prozentsatz von 15,4 % bezogen auf die Gesamtgruppe ($n = 26$) und von 17,4 % bezogen auf die Gruppe mit Zellaufweis ($n = 23$) entsprach. Bei drei Tieren lag die Zellzahl unter 0,2 Zellen/Gesichtsfeld (0,1 - 0,14). Eine Stute wies mit 10,7 Zellen pro Gesichtsfeld einen stark erhöhten Gehalt an neutrophilen Granulozyten auf. Die mittlere Zellzahl neutrophiler Granulozyten aller Stuten lag bei $0,43 \pm 2,10$ (Median 0) Zellen pro Gesichtsfeld. Bei den vier Stuten mit Nachweis neutrophiler Granulozyten lag die mittlere Dichte bei $2,77 \pm 5,29$ (Median 0,14) Zellen pro Gesichtsfeld.

Ein statistisch signifikanter Einfluss der peripheren Hormonkonzentrationen auf die Zahl neutrophiler Granulozyten in den Endometriumszytologien war nicht vorhanden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen der neutrophilen Granulozytenzahl in exfoliativen Endometriumszytologien von Stuten ($n = 21$) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. Es lagen keine statistisch signifikanten Korrelationen vor.

	Östradiol-17 β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	0,03	-0,10	0,13
p-Wert	0,90	0,68	0,58

Das arithmetische Mittel des Neutrophilen-Index aller Stuten lag bei $0,01 \pm 0,05$ (Median 0). Bei den vier Stuten mit Nachweis neutrophiler Granulozyten lag der arithmetische Mittelwert des Neutrophilen-Index bei $0,01 \pm 0,11$ (Median 0,008).

Es lagen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Neutrophilen-Index und den Plasma-Hormonkonzentrationen vor (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen dem Neutrophilen-Index in exfoliativen Endometriumszytologien von Stuten (n = 21) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. Es lagen keine statistisch signifikanten Korrelationen vor.

	Östrogene	Progesteron	Östradiol/Progesteron-Quotient
Korrelationskoeffizient	-0,01	-0,16	0,17
p-Wert	0,98	0,50	0,46

4.4 Korrelation der Ergebnisse zwischen den exfoliativen Zervikal- und Endometriumszytologien

Gesamtzellzahl

In den Zervikalzytologien konnten bei 69 % der Stuten Zellen nachgewiesen werden, hingegen bei den Endometriumszytologien bei 88,5 % der Stuten. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl lag bei den Zervikalzytologien bei $10,9 \pm 12,8$ (Median 9,5) Zellen und bei den Endometriumszytologien bei $15,1 \pm 14,7$ (Median 11,2) Zellen pro Gesichtsfeld (Tabelle 13, Abbildung 10). Die Gesamtzellzahlen der Zytologien von Zervix und Uterus bei den einzelnen Stuten zeigten eine signifikante positive Korrelation ($r = 0,50$, $p = 0,009$) (Abbildung 11).

Tabelle 13: Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld der Zervikal- und Endometriumszytologien, dargestellt als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median (n = 26). Zwischen den Lokalisationen bestand eine statistisch signifikante Korrelation ($r = 0,50$; $p = 0,009$).

	Endometriumszytologien	Zervikalzytologien
$x_a \pm SA$	$15,11 \pm 14,75$	$10,99 \pm 12,86$
Median	11,2	9,5

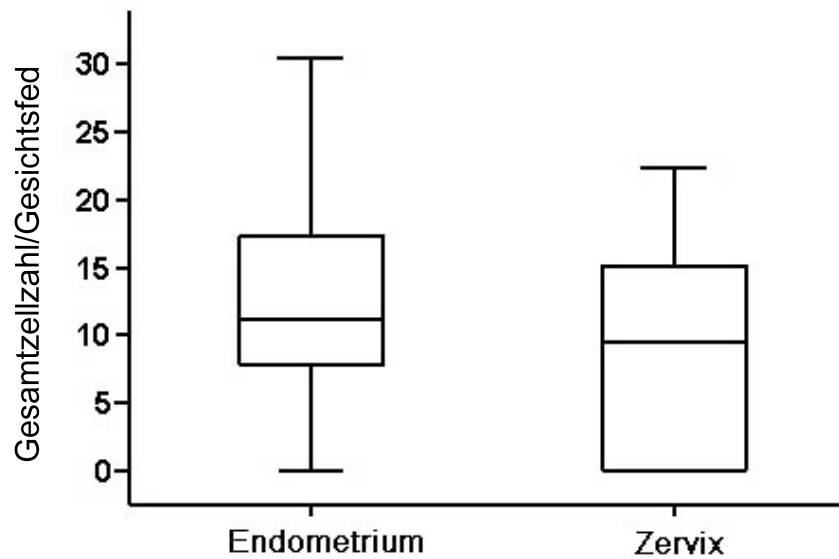


Abbildung 10: Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld in den exfoliativen Endometriums- und Zervikalzytologien von Stuten (n = 26), dargestellt als Box and Whisker Plot. Die Korrelation zwischen den beiden Lokalisationen war statistisch signifikant ($r = 0,50$; $p = 0,009$).

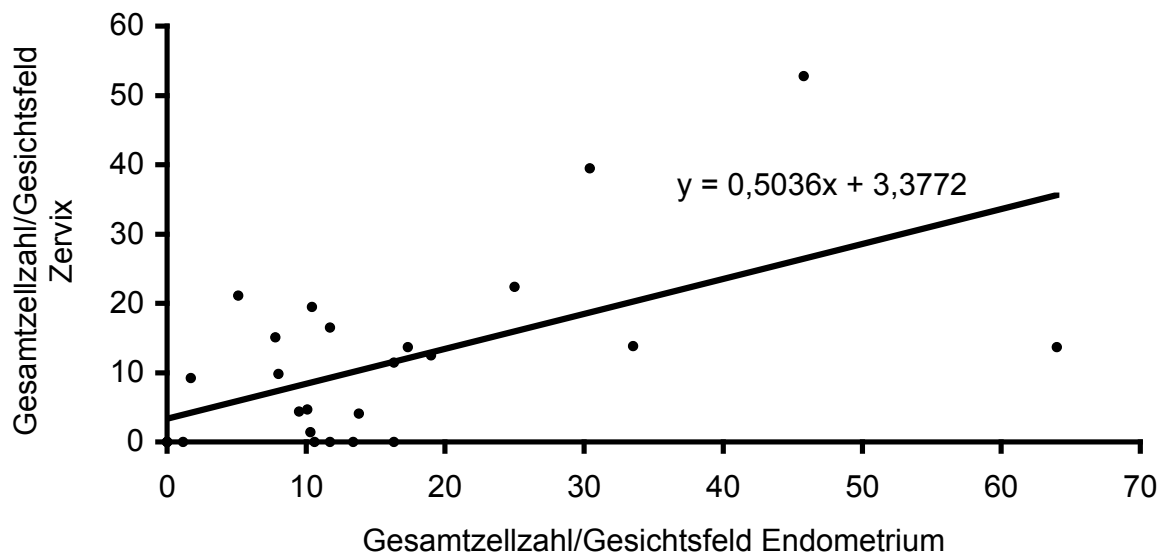


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen den Gesamtzellzahlen der exfoliativen Endometriums- und Zervikalzytologien von Stuten (n = 26) in Zellen/Gesichtsfeld. Die Korrelation war statistisch signifikant ($r = 0,50$; $p = 0,009$).

Erythrozyten

Von sieben Stuten, bei denen in der exfoliativen Endometriumszytologie Erythrozyten gefunden werden konnten, wiesen fünf Tiere auch rote Blutkörperchen in der exfoliativen Zervikalzytologie auf (71,4 %). Je zwei Stuten wiesen ausschliesslich in der Endometriumszytologie oder der Zervikalzytologie Erythrozyten auf.

Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten waren in fünf der Zervixausstriche präsent (19,2 %). Bei zwei dieser fünf Stuten konnten auch in den Endometriumszytologien neutrophile Granulozyten detektiert werden. Eine Stute wies sowohl in der Endometriumszytologie als auch in der Zervikalzytologie stark erhöhte neutrophile Granulozyten-Gehalte auf (Zervikalzytologie 6,4 Zellen pro Gesichtsfeld, Endometriumszytologie 10,7 Zellen pro Gesichtsfeld). Drei Tiere (11,5 %) wiesen einen isolierten Nachweis von neutrophilen Granulozyten in der Zervix auf. Bei zwei weiteren Stuten (7,7 %) fanden sich nur in der exfoliativen Zytologie des Endometriums neutrophile Granulozyten.

Zwischen der neutrophilen Granulozyten-Zahl in den Zervikalzytologien und der Zahl in den Endometriumszytologien bestand keine statistisch signifikante Korrelation ($r = 0,36$, $p = 0,07$).

4.5 Allgemeine histologische Beschreibung

Das Epithel der Vagina zeigte einen typischen mehrschichtigen Aufbau. Über basal gelagerten polyedrischen Zellen liess sich eine Schicht mit abgeflachten Zellen darstellen. In den Vaginalschnitten war bei keiner Stute weder eine Infiltration mit Entzündungszellen noch eine Hyperämie zu finden (Abbildung 12).

In der Hämatoxylin-Eosin Färbung der Zervix-Präparate war die typische Schichtung der *Tunica mucosa* in Epithel und *Lamina propria mucosae* zu erkennen. Deutlich liess sich eine Sekundär- und Tertiärfältelung darstellen. Der überwiegende Anteil der Epithelzellen wies einen Kinoziliensaum im Bereich der apikalen Membran auf (Abbildung 13).

Typisch für die Proben aus der Gebärmutter war ein einschichtiges hochprismatisches Oberflächenepithel und das Vorkommen von Uterindrüsen (Abbildung 14).

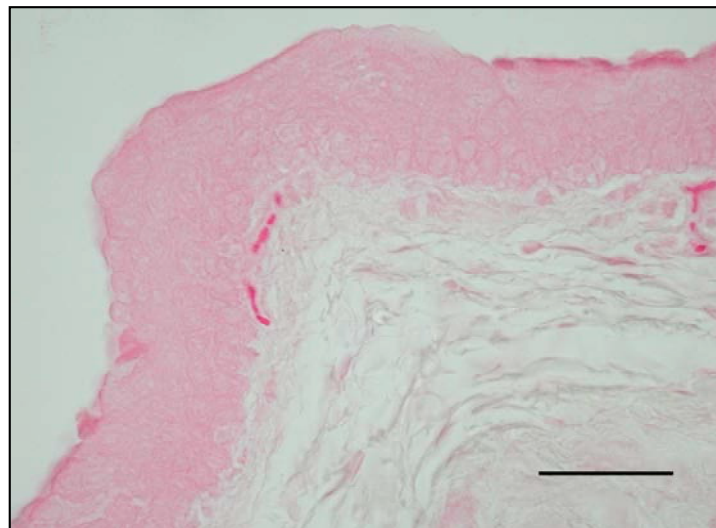


Abbildung 12: Vaginalgewebe einer gesunden Stute, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Balkenlänge 50 μm).

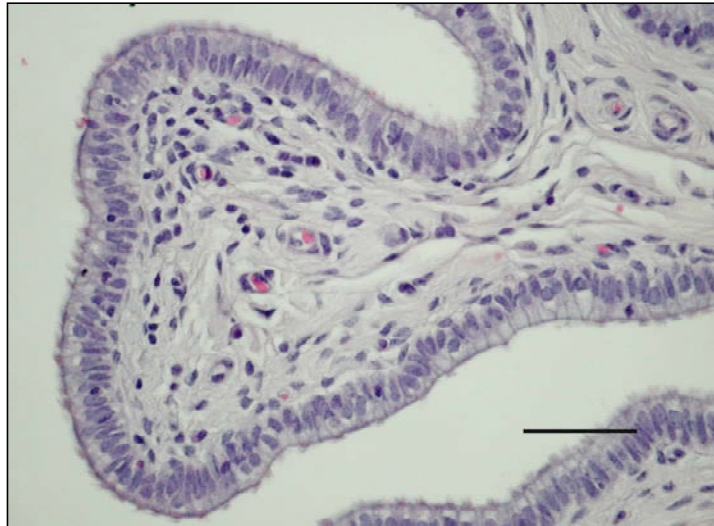


Abbildung 13: Equines Zervikalgewebe mit Tertiärfältelung und Kinozilien-saum, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Balkenlänge 50 μm).

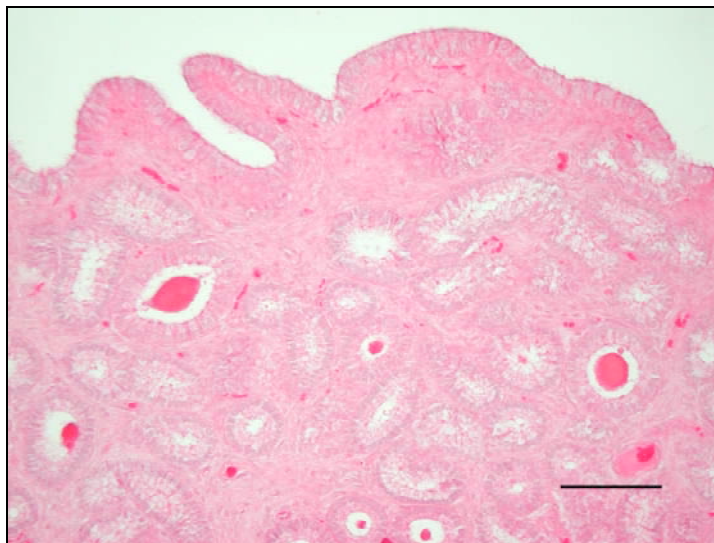


Abbildung 14: Equines Uterusgewebe mit Epithel und Uterindrüsen, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Balkenlänge 100 μm).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in der lichtmikroskopischen Darstellung eine eindeutige Zuordnung von Vagina, Zervix und Uterus möglich war.

4.6 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten liessen sich mittels der Sirius-Red-Färbung eindeutig darstellen. Durch ihre Affinität zu acidophilen Farbstoffen stellten sich die Granula der eosinophilen Granulozyten leuchtend rot dar (Abbildung 15). Als grösste Spezies unter den Granulozyten waren sie in der 400-fachen Vergrösserung gut anzusprechen. Die Grösse schwankte aufgrund der unterschiedlichen Schnittflächen stark. Der maximale Durchmesser lag bei 12 – 14 μm . Die Form variierte zwischen rund und länglich-oval. Die rundlich bis ovalen Granula füllten die Zelle oftmals vollständig aus, so dass die eosinophilen Granulozyten die Form einer Brombeere annahmen. Die Grösse der Granula war sehr unterschiedlich, die grössten erreichten einen Durchmesser von bis zu 4 μm .

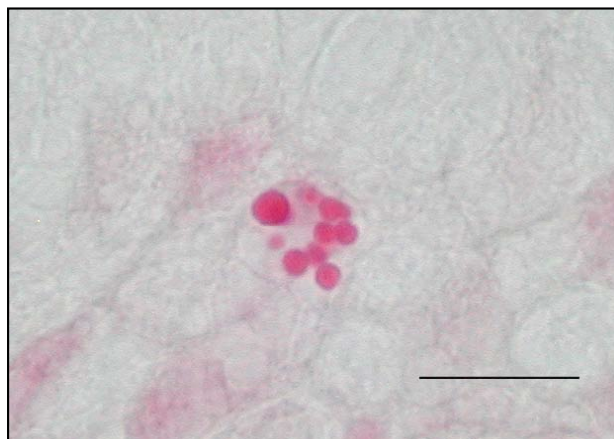


Abbildung 15: Eosinophiler Granulozyt im zervikalen Bindegewebe einer östrischen Stute mit deutlich erkennbaren Granula in verschiedenen Grössen, Sirius-Red-Färbung (Balkenlänge 10 μm).

Der Nachweis eosinophiler Granulozyten in den somatischen Organen gelang in sämtlichen Sirius-Red gefärbten Schnitten der 19 Stuten. Besonders stark infiltriert durch eosinophile Granulozyten war der Dünndarm mit $108,5 \pm 70,86$ (Median 104,2) Zellen/ mm^2 (Tabelle 14, Abbildung 16). Daher wurde der Dünndarm als Kontrollorgan bei jeder Färbung mitgeführt.

Tabelle 14: Dichte eosinophiler Granulozyten (Zellen/mm²) in den Organen Leber, Milz und Dünndarm von Stuten, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median (n = 19).

	Leber	Milz	Darm
$\bar{x}_a \pm SA$	2,7 \pm 3,1	43,4 \pm 28,3	108,5 \pm 70,86
Median	1,9	35,7	104,2

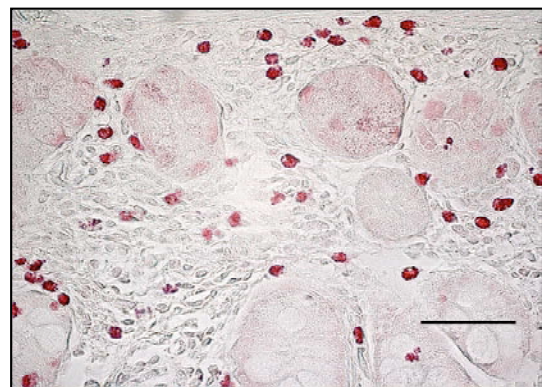
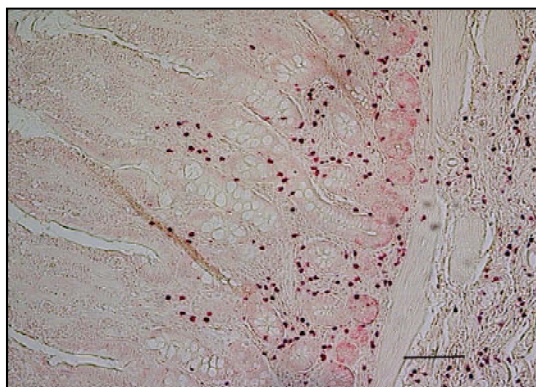


Abbildung 16: Eosinophile Granulozyten im Dünndarm einer Stute, Sirius-Red-Färbung (Balkenlänge links 100 µm, rechts 50 µm).

4.6.1 Vagina

Eosinophile Granulozyten konnten in vier der 19 Vaginalhistologien (21,1 %) detektiert werden. Sie befanden sich in erster Linie in der *Lamina propria mucosae*. Die durchschnittliche Dichte bei diesen vier Stuten mit eosinophilen Granulozyten in der Vagina lag bei $0,11 \pm 0,07$ (Median 0,08) Zellen/mm². Die Gesamtzellzahl bezogen auf alle 19 Stuten betrug $0,02 \pm 0,05$ (Median 0) Zellen/mm².

Die Anzahl eosinophiler Granulozyten in den verschiedenen Zyklusstadien war unterschiedlich. In der Gruppe der östrischen Tiere fanden sich keine eosinophilen Granulozyten. Die diöstrischen Tiere wiesen mit $0,04 \pm 0,07$ (Median 0) Zellen/mm² die grösste Zelldichte auf (Tabelle 15). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zyklusstadien lagen nicht vor (Tabelle 16).

Tabelle 15: Dichte eosinophiler Granulozyten im Vaginalgewebe von Stuten (n = 19) der verschiedenen Zyklusstadien in Zellen/mm², angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median. Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

	Anöstrus	Diöstrus	Östrus	Gesamt
$\bar{x}_a \pm SA$	0,009 \pm 0,03	0,04 \pm 0,07	Kein Nachweis	0,02 \pm 0,05
Median	0	0	Kein Nachweis	0

Tabelle 16: Statistische Unterschiede zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten im Vaginalgewebe von Stuten in verschiedenen Zyklusphasen (n = 19). Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
Anöstrus	Diöstrus	0,48
Anöstrus	Östrus	0,89
Diöstrus	Östrus	0,58

Es bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Hormonkonzentrationen und der Dichte eosinophiler Granulozyten im Vaginalgewebe (Tabelle 17).

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten im Vaginalgewebe von Stuten (n = 19) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma.

	Östradiol-17β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	0,10	0,43	-0,27
p-Wert	0,70	0,07	0,27

4.6.2 Zervix

Bei 18 der 19 Proben gelang der Nachweis von eosinophilen Granulozyten in der Zervix mittels der Sirius-Red-Färbung (94,7 %). Der grösste Anteil der Zellen konnte epithelnah in der *Lamina propria mucosae* detektiert werden (Abbildung 17). Die Dichte eosinophiler Granulozyten in der gesamten Zervix lag bei $1,82 \pm 4,17$ (Median 0,2) Zellen/mm².

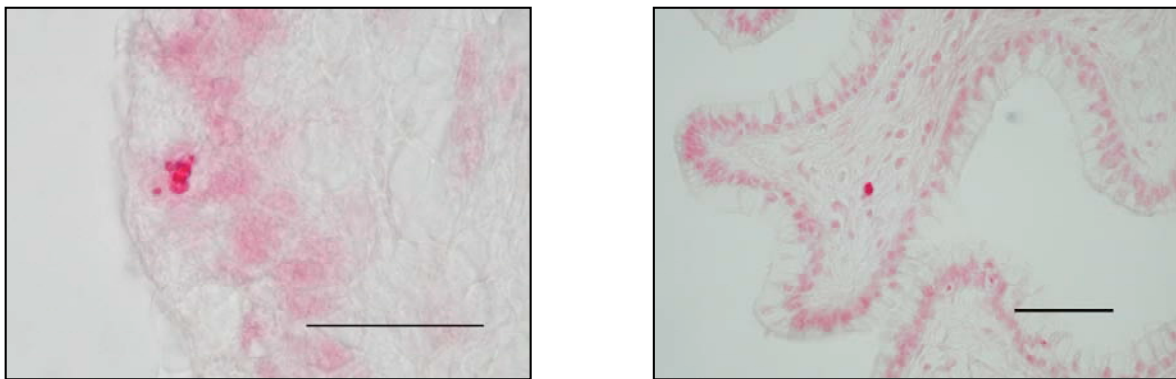


Abbildung 17: Eosinophile Granulozyten in der Stutenzervix, Sirius-Red-Färbung (Balkenlänge links 25 µm, rechts 50 µm).

Die höchste Dichte eosinophiler Granulozyten mit $1,02 \pm 3,06$ Zellen/mm² fand sich in der uterusnahen Region (Region 1) der Zervix. Die Zellinfiltration nahm nach caudal ab und lag in der Region 5 noch bei $0,06 \pm 0,11$ Zellen/mm² (Tabelle 18). Die lokalen Unterschiede waren nicht statistisch signifikant ($p = 0,12$).

Tabelle 18: Dichte der eosinophilen Granulozyten von cranial (R1) nach caudal (R5) in der Zervix von Stuten ($n = 19$) in Zellen/mm², angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median. Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5
$x_a \pm SA$	$1,10 \pm 3,2$	$0,27 \pm 0,60$	$0,27 \pm 0,9$	$0,11 \pm 0,29$	$0,06 \pm 0,11$
Median	0,05	0,05	0,03	0	0,04

Die Dichte eosinophiler Granulozyten aller Regionen (Summe aus den Regionen 1 bis 5) zeigte zwischen den Zyklusgruppen deutliche Unterschiede. Die Stuten im Östrus wiesen mit $13,35 \pm 0,21$ (Median 13,34) Zellen/mm² die mit Abstand stärkste Infiltration auf. Die anöstrischen Tiere erreichten nur eine Eosinophilen-Dichte von $0,31 \pm 0,28$ (Median 0,21) und die diöstrischen Tiere eine Dichte von $0,59 \pm 1,37$ (Median 0,10) Zellen/mm² (Tabelle 19). Die Zahl der eosinophilen Granulozyten in der Gruppe der östrischen Tiere war im Vergleich zu den anöstrischen ($p = 0,04$) und diöstrischen ($p = 0,04$) Tieren statistisch signifikant erhöht (Tabelle 20, Abbildung 18).

Tabelle 19: Dichte eosinophiler Granulozyten im gesamten Zervikalgewebe der Stuten in den verschiedenen Zyklusstadien in Zellen/mm², dargestellt als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von den Zyklusphasen Anöstrus ($p = 0,04$) und Diöstrus ($p = 0,04$).

	Anöstrus	Diöstrus	Östrus	Gesamt
$\bar{x}_a \pm SA$	0,31 \pm 0,28	0,59 \pm 1,37	13,35 \pm 0,21	1,82 \pm 4,17
Median	0,21	0,10	13,34	0,20

Tabelle 20: Statistische Unterschiede zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten im gesamten Zervikalgewebe von Stuten in den verschiedenen Zyklusgruppen (n = 19). Zwischen Anöstrus und Östrus sowie zwischen Diöstrus und Östrus bestand ein statistisch signifikanter Unterschied.

Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
Anöstrus	Diöstrus	0,28
Anöstrus	Östrus	0,04
Diöstrus	Östrus	0,04

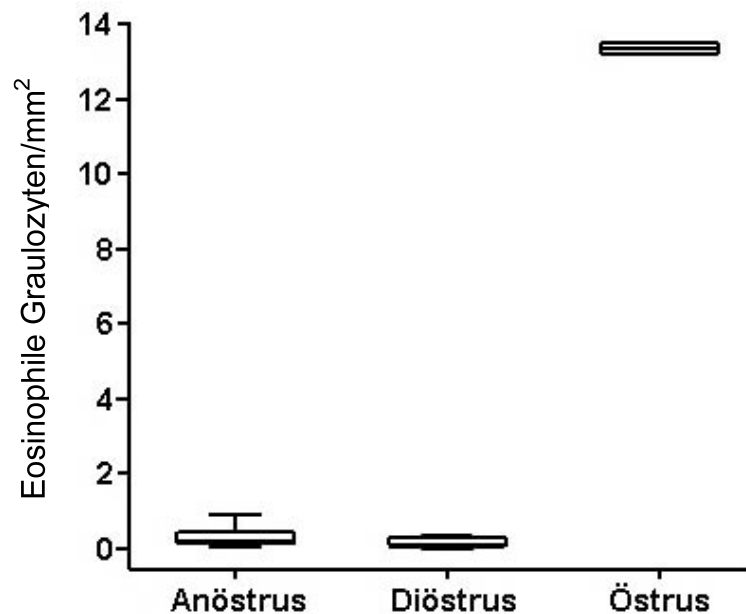


Abbildung 18: Dichte eosinophiler Granulozyten/mm² im gesamten Zervikalgewebe von Stuten in den einzelnen Zyklusstadien, dargestellt als Box and Whisker Plot (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von den Zyklusphasen Anöstrus (p = 0,04) und Diöstrus (p = 0,04).

Die Zyklusabhängigkeit der Zelldichte eosinophiler Granulozyten in den einzelnen Regionen (R1 - R5) der Zervix ist in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Dichte eosinophiler Granulozyten/mm² der fünf Zervixregionen in den verschiedenen Zyklusstadien bei Stuten (n = 19), angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median.

Zyklusgruppe		Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5
Anöstrus	$\bar{x}_a \pm SA$	0,06 \pm 0,05	0,15 \pm 0,22	0,04 \pm 0,14	0,03 \pm 0,09	0,03 \pm 0,04
	Median	0,04	0,06	0,03	0,02	0,01
Diöstrus	$\bar{x}_a \pm SA$	0,12 \pm 0,27	0,31 \pm 0,87	0,07 \pm 0,14	0,05 \pm 0,09	0,04 \pm 0,04
	Median	0,03	0,02	0	0	0,05
Östrus	$\bar{x}_a \pm SA$	9,66 \pm 4,59	0,60 \pm 0,57	2,07 \pm 2,70	0,70 \pm 0,84	0,32 \pm 0,26
	Median	9,65	0,60	2,07	0,70	0,32

Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich in den Regionen 1, 3, 4 und 5 zwischen den anöstrischen und den östrischen Tieren sowie in den Regionen 1 und 5 zwischen den diöstrischen und den östrischen Tieren (Tabelle 22, Abbildung 19 bis 22).

Tabelle 22: Statistische Unterschiede zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten in den Zervixregionen 1 bis 5 von Stuten in den verschiedenen Zyklusgruppen (n = 19). Zwischen Anöstrus und Östrus lagen in den Regionen 1, 3, 4 und 5 sowie zwischen Diöstrus und Östrus in den Regionen 1 und 5 statistisch signifikante Unterschiede vor.

Region	Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
R 1	Anöstrus	Diöstrus	0,61
	Anöstrus	Östrus	0,04
	Diöstrus	Östrus	0,04
R 2	Anöstrus	Diöstrus	0,24
	Anöstrus	Östrus	0,18
	Diöstrus	Östrus	0,15
R 3	Anöstrus	Diöstrus	0,32
	Anöstrus	Östrus	0,04
	Diöstrus	Östrus	0,07
R 4	Anöstrus	Diöstrus	1,00
	Anöstrus	Östrus	0,04
	Diöstrus	Östrus	0,15
R 5	Anöstrus	Diöstrus	0,61
	Anöstrus	Östrus	0,04
	Diöstrus	Östrus	0,04

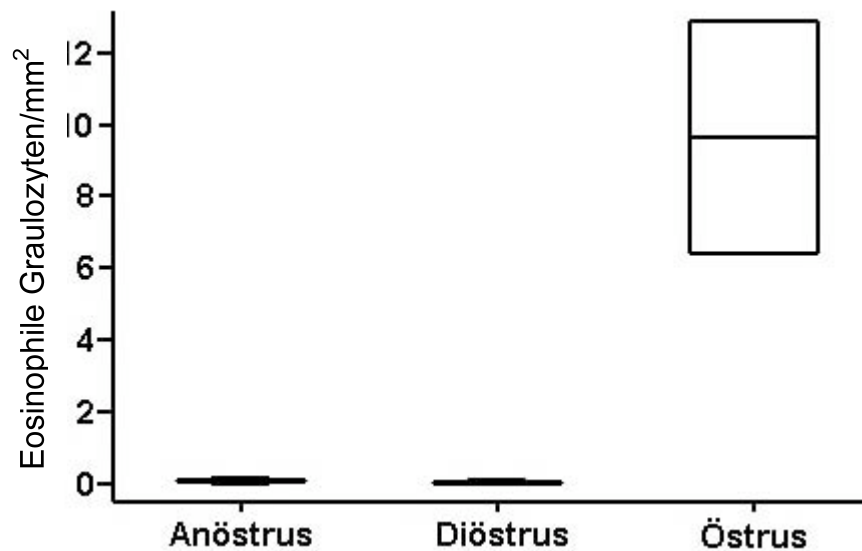


Abbildung 19: Dichte eosinophiler Granulozyten/mm² in Region 1 (cranial) des Zervikalgewebes von Stuten in den einzelnen Zyklusstadien, dargestellt als Box and Whisker Plot (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von der in den Zyklusphasen Anöstrus (p = 0,04) und Diöstrus (p = 0,04).

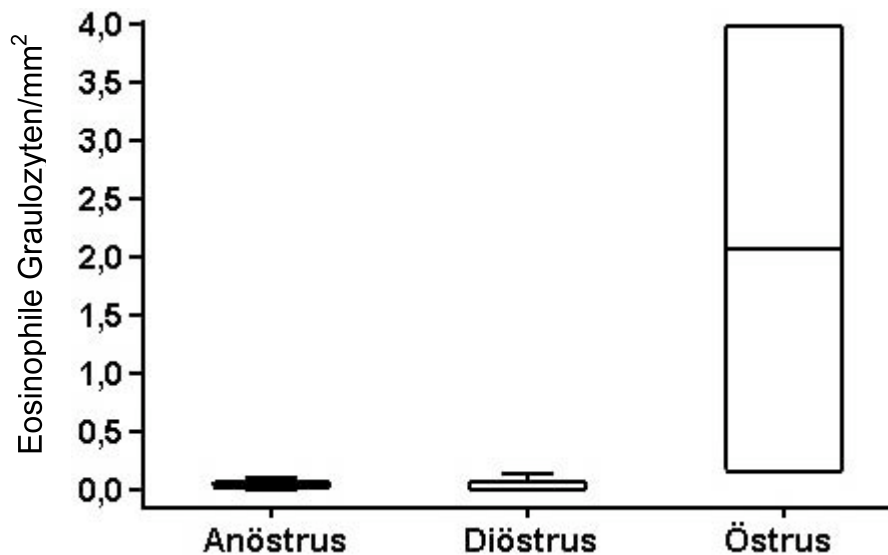


Abbildung 20: Dichte eosinophiler Granulozyten/mm² in Region 3 des Zervikalgewebes von Stuten in den einzelnen Zyklusstadien, dargestellt als Box and Whisker Plot (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von der im Anöstrus (p = 0,04).

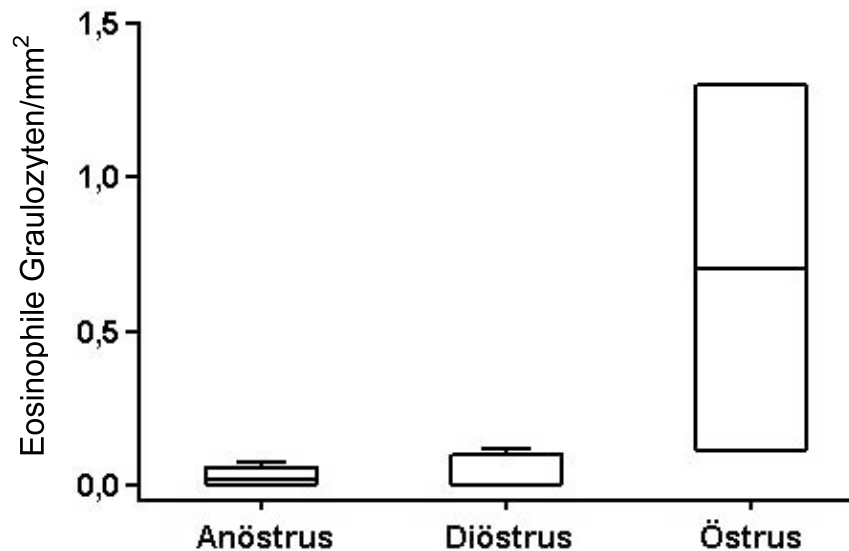


Abbildung 21: Dichte eosinophiler Granulozyten/mm² in Region 4 des Zervikalgewebes von Stuten in den einzelnen Zyklusstadien, dargestellt als Box and Whisker Plot (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von der im Anöstrus (p = 0,04).

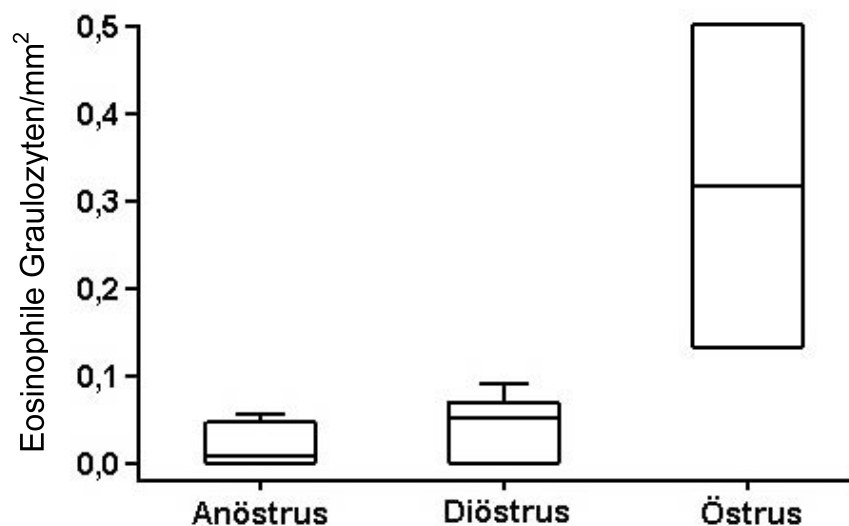


Abbildung 22: Dichte eosinophiler Granulozyten/mm² in Region 5 (caudal) des Zervikalgewebes von Stuten in den einzelnen Zyklusstadien, dargestellt als Box and Whisker Plot (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von der in den Zyklusphasen Anöstrus (p = 0,04) und Diöstrus (p = 0,04).

Ein Einfluss der Hormonkonzentrationen auf die Dichte der eosinophilen Granulozyten liess sich in einer zusammenfassenden Betrachtung der fünf Zervixregionen statistisch nicht nachweisen (Tabelle 23). Es wurde trotzdem deutlich, dass sowohl eine steigende Plasmakonzentration von Östradiol-17 β als auch ein steigender Östradiol/Progesteron-Quotient zu einem Anstieg der Dichte eosinophiler Granulozyten im zervikalen Gewebe führten. Bei steigenden Progesteronkonzentrationen sank hingegen die Dichte eosinophiler Granulozyten im Zervikalgewebe von Stuten.

Tabelle 23: Zusammenhang zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten im gesamten Zervikalgewebe (R1 - R5) von Stuten (n = 19) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma.

	Östradiol-17 β	Progesteron	Östradiol/Progesteron-Quotient
Korrelationskoeffizient	0,24	-0,33	0,39
p-Wert	0,32	0,17	0,10

In den einzelnen Regionen spiegelt sich das tendenzielle Bild der gesamten Zervix wieder. Steigende Östrogenkonzentrationen führten zu einem Anstieg der Dichte eosinophiler Granulozyten im Zervikalgewebe. Progesteron führte im Gegensatz dazu zum Absinken der Eosinophilendichte. So fand sich in der Region 2 der Zervix eine statistisch signifikante Zunahme eosinophiler Granulozyten bei steigendem Östradiol/Progesteron-Quotienten (Tabelle 24, Abbildung 23).

Tabelle 24: Zusammenhang zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten in den einzelnen Regionen des Zervikalgewebes von Stuten (n = 19) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. In der Region 2 zeigte sich eine statistisch signifikante Abhängigkeit vom Östradiol/Progesteron-Quotienten ($p = 0,02$).

Zervix-Region		Östradiol-17 β	Progesteron	Östradiol/Progesteron-Quotient
R1	Korrelationskoeffizient	0,22	-0,24	0,36
	p-Wert	0,36	0,32	0,13
R2	Korrelationskoeffizient	0,44	-0,21	0,52
	p-Wert	0,06	0,38	0,02
R3	Korrelationskoeffizient	0,06	-0,30	0,21
	p-Wert	0,82	0,21	0,34
R4	Korrelationskoeffizient	0,40	0,06	0,25
	p-Wert	0,09	0,82	0,30
R5	Korrelationskoeffizient	0,02	-0,42	0,01
	p-Wert	0,93	0,87	0,10

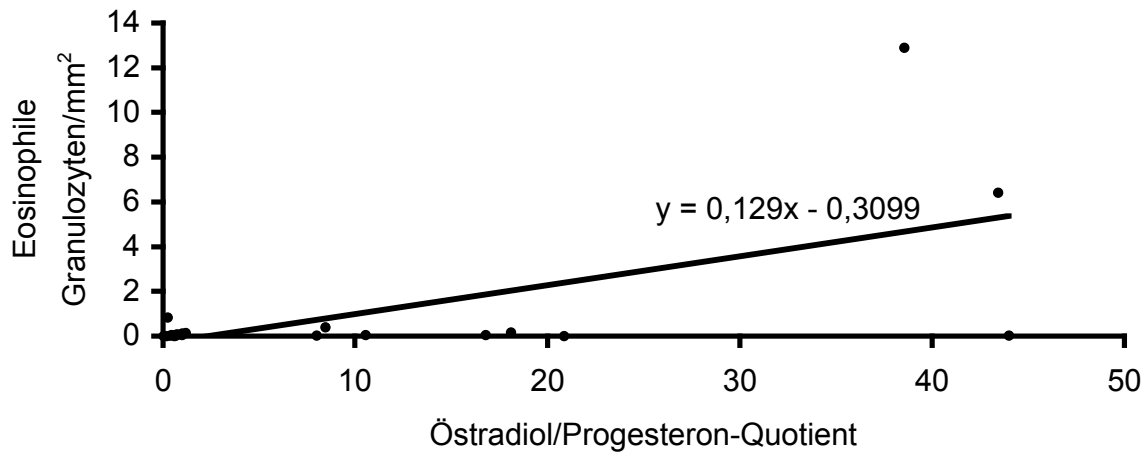


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten in der Region 2 der Zervix von Stuten (n = 19) und dem Östradiol/Progesteron-Quotienten im Plasma ($r = 0,52$; $p = 0,02$).

4.6.3 Uterus

Eosinophile Granulozyten konnten bei sechs der 19 Stuten nachgewiesen werden (31,6 %). Die durchschnittliche Zellzahl lag bei diesen sechs Proben bei $0,65 \pm 0,80$ (Median 0,34) Zellen/mm². In der Gesamtgruppe (n = 19) betrug die durchschnittliche Zellzahl $0,21 \pm 0,53$ (Median 0) Zellen/mm².

Die Dichte eosinophiler Granulozyten in den verschiedenen Zyklusstadien war unterschiedlich. In der Gruppe der östrischen Tiere konnten eosinophile Granulozyten in einer Dichte von $1,12 \pm 1,58$ (Median 1,12) Zellen/mm² nachgewiesen werden. Die diöstrischen Tiere mit $0,10 \pm 0,24$ (Median 0) Zellen/mm² und die anöstrischen Tiere mit $0,09 \pm 0,16$ (Median 0) Zellen/mm² wiesen deutlich geringere Zelldichten auf (Tabelle 25). Statistisch signifikante Zusammenhänge lagen nicht vor (Tabelle 26).

Tabelle 25: Dichte eosinophiler Granulozyten im Uterusgewebe von Stuten (n = 19) in den verschiedenen Zyklusstadien in Zellen/mm², angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median. Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

	Anöstrus	Diöstrus	Östrus	Gesamt
$\bar{x}_a \pm SA$	0,09 \pm 0,16	0,10 \pm 0,16	1,12 \pm 1,58	0,21 \pm 0,53
Median	0	0	1,12	0

Tabelle 26: Statistische Unterschiede zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten im Uterusgewebe von Stuten in den verschiedenen Zyklusgruppen (n = 19). Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
Anöstrus	Diöstrus	0,67
Anöstrus	Östrus	0,53
Diöstrus	Östrus	0,44

Bei steigenden Progesteronkonzentrationen sank die Zahl eosinophiler Granulozyten ab, während eine positive Korrelation zwischen der Östradiol-17 β -Konzentration und der Zelldichte bestand. Diese Zusammenhänge waren jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 27).

Tabelle 27: Zusammenhang zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten im Uterusgewebe von Stuten (n = 19) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. Es lagen keine statistisch signifikanten Korrelationen vor.

	Östradiol-17β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	0,16	-0,07	0,27
p-Wert	0,50	0,78	0,27

4.6.4 Korrelation der Dichte eosinophiler Granulozyten in den Genitalorganen

Am häufigsten gelang der Nachweis eosinophiler Granulozyten in der Zervix. Während sich in der Zervix bei 18 von 19 Stuten (94,7 %) eosinophile Granulozyten befanden, gelang der Nachweis in der Vagina nur bei vier Stuten (21,1 %) sowie im Uterusgewebe bei sechs Stuten (31,6 %). Die grösste Dichte eosinophiler Granulozyten fand sich im Zervikalgewebe mit $1,82 \pm 4,17$ (Median 0,2) Zellen/mm². Im Vaginalgewebe lag eine Dichte von $0,02 \pm 0,05$ (Median 0) Zellen/mm² und im Uterusgewebe von $0,21 \pm 0,53$ (Median 0) Zellen/mm² vor (Tabelle 28).

Tabelle 28: Dichte eosinophiler Granulozyten in Vagina, Zervix und Uterus in Zellen/mm². Angegeben sind der arithmetische Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und der Median (n = 19). Es lagen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Organen vor.

	Vagina	Zervix	Uterus
$\bar{x}_a \pm SA$	$0,02 \pm 0,05$	$1,82 \pm 4,17$	$0,21 \pm 0,53$
Median	0	0,2	0

Es lagen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Zelldichten eosinophiler Granulozyten in den Organen Vagina, Zervix und Uterus vor (Tabelle 29).

Tabelle 29: Zusammenhänge der Dichte eosinophiler Granulozyten in den Organen Vagina, Zervix und Uterus von Stuten (n = 19), dargestellt mittels des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r) und dem p-Wert. Es lagen keine statistisch signifikanten Korrelationen vor.

	Vagina	Zervix	Uterus
Vagina		r = -0,38 p = 0,11	r = -0,34 p = 0,16
Zervix	r = -0,38 p = 0,11		r = 0,16 p = 0,51
Uterus	r = -0,34 p = 0,16	r = 0,16 p = 0,51	

4.7 Mastzellen

Die Mastzellen stellten sich in ihrer Form sehr variabel dar. Meist zeichneten sie sich durch ein längsoiales bis sphärisches Erscheinungsbild aus. Mit einer Grösse bis zu 30 μm waren sie deutlich grösser als die eosinophilen Granulozyten. Die Granula der Mastzellen waren fein und über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abbildung 24). Der Zellkern war im Gegensatz zu dem der eosinophilen Granulozyten meist deutlich zu erkennen. Teilweise sammelten sich die Granula in Zytoplasma-Ausläufern. In der Toluidin-Blau-Färbung wiesen die Mastzell-Granula einen metachromatischen Effekt auf, so dass sie in einem Magenta-Rot erschienen.

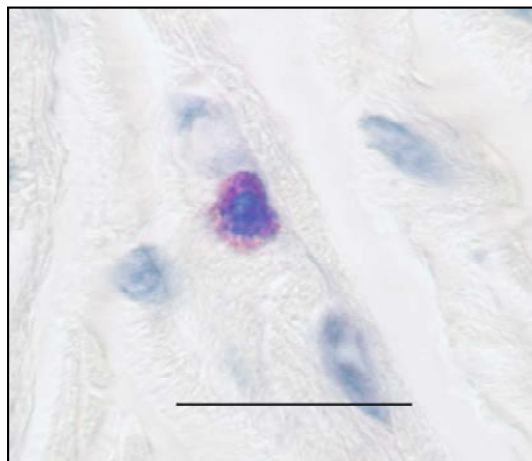


Abbildung 24: Mastzelle im zervikalen Bindegewebe einer anöstrischen Stute mit magentafarbenen Granula, die gleichmässig den Zellkern umgeben, Toluidin-Blau-Färbung (Balkenlänge 25 μm).

In den histologischen Schnitten des Dünndarms konnten bei allen Stuten Mastzellen nachgewiesen werden. Der arithmetische Mittelwert lag bei $14,48 \pm 11,56$ (Median 11,56) Zellen/ mm^2 . Bei zwei Pferden (10,5 %) liessen sich Mastzellen mit einer mittleren Zellzahl von $0,24 \pm 0,16$ (Median 0,24) Zellen/ mm^2 in der Leber darstellen. In der Milz fanden sich bei keiner Stute Mastzellen.

4.7.1 Vagina

Mastzellen konnten in neun der 19 Vaginalhistologien (47,4 %) der Stuten detektiert werden. Diese befanden sich in erster Linie in der *Lamina propria mucosae*. Die durchschnittliche Anzahl bei diesen neun Stuten mit Mastzellen-Nachweis lag bei $1,24 \pm 1,57$ (Median 0,51) Zellen/mm². Bezogen auf alle 19 Stuten ergab sich eine durchschnittliche Dichte von $0,59 \pm 1,23$ (Median 0) Zellen/mm².

Die Anzahl an Mastzellen in den verschiedenen Zyklusstadien war unterschiedlich. In der Gruppe der östrischen Tiere konnten Mastzellen in einer Dichte von $1,74 \pm 2,46$ (Median 1,74) Zellen/mm² nachgewiesen werden. Die diöstrischen Tiere mit $0,58 \pm 1,41$ (Median 0) Zellen/mm² und die anöstrischen Tiere mit $0,31 \pm 0,53$ (Median 0,03) Zellen/mm² wiesen deutlich geringere Zelldichten auf (Tabelle 30). Statistisch signifikante Unterschiede lagen keine vor (Tabelle 31).

Tabelle 30: Mastzellendichte im Vaginalgewebe von Stuten (n = 19) in den verschiedenen Zyklusstadien, angegeben in Zellen/mm². Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

	Anöstrus	Diöstrus	Östrus	Gesamt
$\bar{x}_a \pm SA$	$0,31 \pm 0,53$	$0,58 \pm 1,41$	$1,74 \pm 2,46$	$0,59 \pm 1,23$
Median	0,03	0	1,74	0

Tabelle 31: Statistische Unterschiede zwischen der Mastzellendichte im Vaginalgewebe von Stuten in den verschiedenen Zyklusgruppen (n = 19). Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
Anöstrus	Diöstrus	0,88
Anöstrus	Östrus	0,71
Diöstrus	Östrus	0,73

Ein statistisch signifikanter Einfluss der Hormonkonzentrationen auf die Dichte der Mastzellen im Vaginalgewebe konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 32).

Tabelle 32: Zusammenhang zwischen der Mastzellen-Dichte im Vaginalgewebe von Stuten (n = 19) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. Es lagen keine statistisch signifikanten Korrelationen vor.

	Östradiol-17 β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	0,36	0,23	0,09
p-Wert	0,12	0,36	0,71

4.7.2 Zervix

Bei 18 der 19 Proben gelang der Nachweis von Mastzellen in der Zervix der Stute mittels der Toluidin-Blau-Färbung (94,7 %) (Abbildung 25). Die Dichte der Mastzellen im Zervikalgewebe lag bei durchschnittlich $3,72 \pm 7,09$ (Median 1,13) Zellen/mm². Die Mastzellen fanden sich gleichmässig in der *Lamina propria mucosae* und vereinzelt auch in der *Tunica muscularis* verteilt.

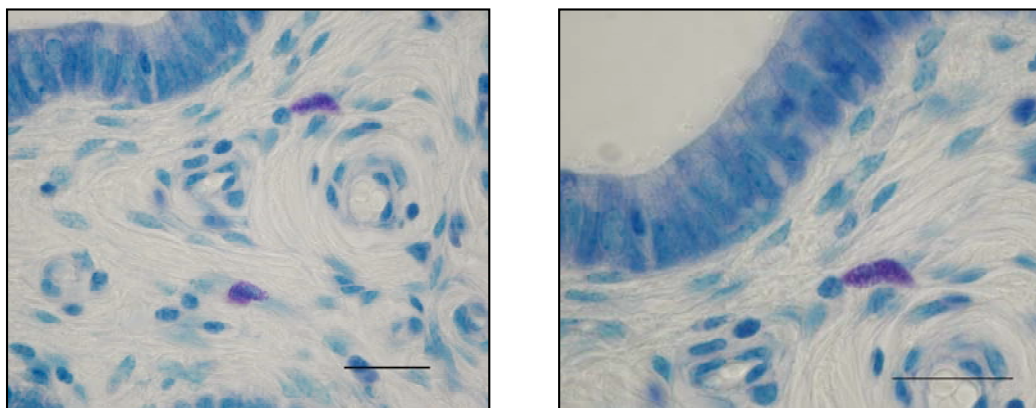


Abbildung 25: Mastzellen im Zervikalgewebe einer Stute, Toluidin-Blau-Färbung (Balkenlänge 25 μ m).

Der Gehalt an Mastzellen entlang des *Canalis cervicis* unterlag nur geringen Schwankungen. Mit $0,91 \pm 1,63$ (Median 0,21) Zellen/mm² wurden in der uterusnahen Region 1 maximale Werte erreicht. Die Region 4 war mit $0,54 \pm 0,93$ (Median 0,13) Zellen/mm² die Region mit der geringsten Mastzellen-Infiltration (Tabelle 33). Statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,91$).

Tabelle 33: Mastzellendichte/mm² in den Zervix-Regionen 1 (cranial) bis 5 (caudal) der Stuten ($n = 19$), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median. Statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Regionen festgestellt werden ($p = 0,91$).

	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5
$x_a \pm SA$	$0,91 \pm 1,63$	$0,77 \pm 1,35$	$0,78 \pm 1,64$	$0,54 \pm 0,93$	$0,76 \pm 1,82$
Median	0,21	0,18	0,09	0,13	0,15

Die Mastzellendichte der Gesamtzervix war in den Zyklusgruppen unterschiedlich. Stuten im Östrus wiesen mit $14,02 \pm 17,63$ (Median 14,02) Zellen/mm² die mit Abstand stärkste Infiltration auf. Die anöstrischen Tiere erreichten eine Dichte von $4,57 \pm 6,45$ (Median 2,01) und die diöstrischen Tiere nur eine Dichte von $0,68 \pm 0,51$ (Median 0,57) Zellen/mm² (Tabelle 34). Es lagen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede vor (Tabelle 35).

Tabelle 34: Mastzellendichte/mm² im gesamten Zervikalgewebe der Stuten in den verschiedenen Zyklusstadien, dargestellt als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median ($n = 19$). Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

	Anöstrus	Diöstrus	Östrus	Gesamt
$x_a \pm SA$	$4,57 \pm 6,45$	$0,68 \pm 0,51$	$14,02 \pm 17,63$	$3,72 \pm 7,09$
Median	2,01	0,57	14,02	1,13

Tabelle 35: Statistische Unterschiede zwischen der Mastzellichte im gesamten Zervikalgewebe von Stuten in den verschiedenen Zyklusgruppen (n = 19). Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
Anöstrus	Diöstrus	0,11
Anöstrus	Östrus	0,53
Diöstrus	Östrus	0,07

Die Zyklusabhängigkeit der Mastzellichte in den einzelnen Regionen der Zervix ist in Tabelle 36 aufgeführt.

Tabelle 36: Mastzell-Dichte/mm² der fünf Zervixregionen in den unterschiedlichen Zyklusstadien bei Stuten (n = 19), angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median. In den Regionen 1 und 3 lagen zwischen den diöstrischen (p = 0,04) und den östrischen (p = 0,04) Tieren statistisch signifikante Unterschiede vor.

Zyklusgruppe		Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5
Anöstrus	$\bar{x}_a \pm SA$	1,11 ± 1,40	1,04 ± 1,16	0,89 ± 0,11	0,77 ± 0,32	0,75 ± 0,15
	Median	0,59	0,71	0,06	0,41	0,23
Diöstrus	$\bar{x}_a \pm SA$	0,15 ± 0,20	0,13 ± 0,14	0,11 ± 0,11	0,16 ± 0,32	0,14 ± 0,15
	Median	0,07	0,08	0,07	0,03	0,14
Östrus	$\bar{x}_a \pm SA$	3,47 ± 3,95	2,54 ± 3,56	3,02 ± 3,24	1,36 ± 1,85	3,62 ± 5,03
	Median	3,47	2,54	3,02	1,36	3,62

In den Regionen 1 und 3 lagen statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den östrischen und den diöstrischen Tieren vor (Tabelle 37, Abbildung 26, Abbildung 27).

Tabelle 37: Statistische Unterschiede zwischen der Mastzellichte in den Zervixregionen 1 (cranial) bis 5 (caudal) von Stuten in den verschiedenen Zyklusgruppen (n = 19). In den Regionen 1 und 3 lagen zwischen den diöstrischen (p = 0,04) und den östrischen (p = 0,04) Tieren statistisch signifikante Unterschiede vor.

Region	Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
R 1	Anöstrus	Diöstrus	0,17
	Anöstrus	Östrus	0,4
	Diöstrus	Östrus	0,04
R 2	Anöstrus	Diöstrus	0,06
	Anöstrus	Östrus	0,89
	Diöstrus	Östrus	0,73
R 3	Anöstrus	Diöstrus	0,96
	Anöstrus	Östrus	0,27
	Diöstrus	Östrus	0,04
R 4	Anöstrus	Diöstrus	0,07
	Anöstrus	Östrus	0,89
	Diöstrus	Östrus	0,33
R 5	Anöstrus	Diöstrus	0,28
	Anöstrus	Östrus	0,71
	Diöstrus	Östrus	0,44

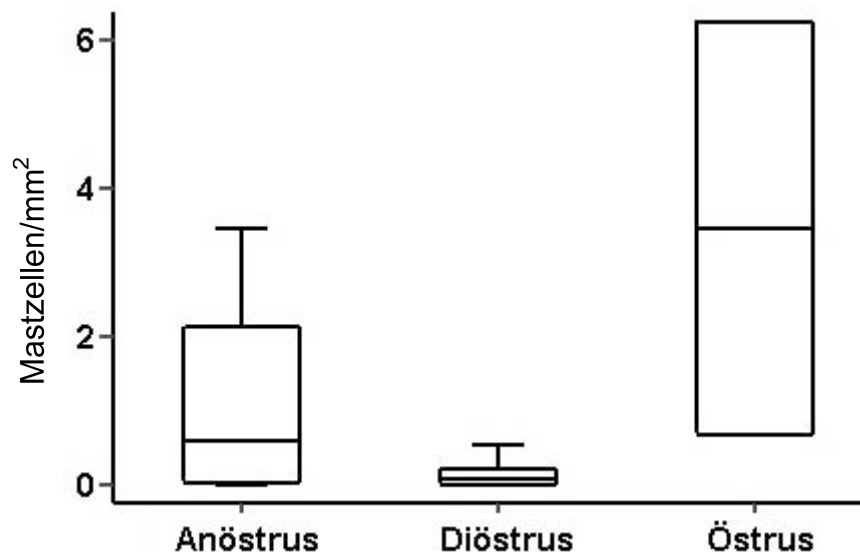


Abbildung 26: Mastzellendichte/mm² in Region 1 des Zervikalgewebes von Stuten in den einzelnen Zyklusstadien, dargestellt als Box and Whisker Plot (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von der im Diöstrus (p = 0,04).

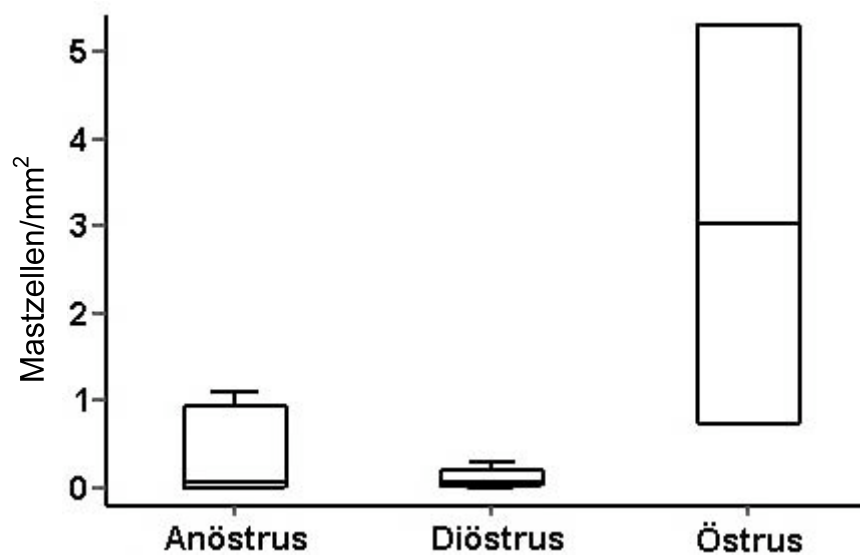


Abbildung 27: Mastzellendichte/mm² in Region 3 des Zervikalgewebes von Stuten in den einzelnen Zyklusstadien, dargestellt als Box and Whisker Plot (n = 19). Die Infiltration im Östrus unterschied sich statistisch signifikant von der im Diöstrus (p = 0,04).

Während bei undifferenzierter Betrachtung in allen Regionen kein Zusammenhang zwischen Mastzelldichte und peripheren Hormonkonzentrationen nachzuweisen war (Tabelle 38), zeigte sich bei einer getrennten Analyse der Regionen 1 bis 5 ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Östradiol-17 β -Konzentration und Mastzelldichte in den Regionen 1 und 5 der Zervix (Tabelle 39, Abbildung 28, Abbildung 29).

Tabelle 38: Zusammenhang zwischen den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma und der Mastzelldichte im gesamten Zervikalgewebe (R 1 - R 5) von Stuten (n = 19).

	Östradiol-17β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	0,43	-0,12	0,38
p-Wert	0,07	0,64	0,11

Tabelle 39: Zusammenhang zwischen der Mastzelldichte in den einzelnen Regionen des Zervikalgewebes von Stuten (n = 19) und den peripheren Hormonkonzentrationen im Plasma. In den Regionen 1 und 5 zeigte sich eine statistisch signifikante Abhängigkeit von der Östradiol-17 β -Konzentration.

Zervix-Region		Östradiol-17 β	Progesteron	Östradiol/Progesteron-Quotient
R1	Korrelationskoeffizient	0,46	-0,16	0,42
	p-Wert	0,05	0,55	0,08
R2	Korrelationskoeffizient	0,31	-0,07	0,30
	p-Wert	0,20	0,79	0,21
R3	Korrelationskoeffizient	0,44	0,09	0,20
	p-Wert	0,06	0,71	0,42
R4	Korrelationskoeffizient	0,27	-0,18	0,29
	p-Wert	0,27	0,82	0,23
R5	Korrelationskoeffizient	0,50	0,08	0,29
	p-Wert	0,03	0,76	0,23

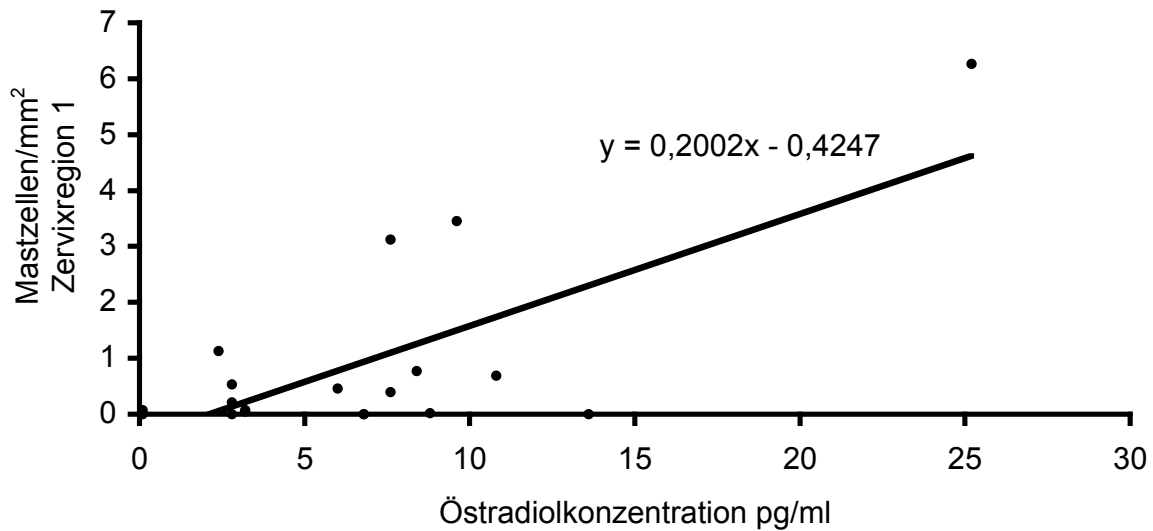


Abbildung 28: Zusammenhang zwischen der Mastzellendichte in der Region 1 der Zervix von Stuten (n = 19) und der Östradiol-17 β -Konzentration im Plasma. Die Korrelation war statistisch signifikant ($r = 0,46$; $p = 0,05$).

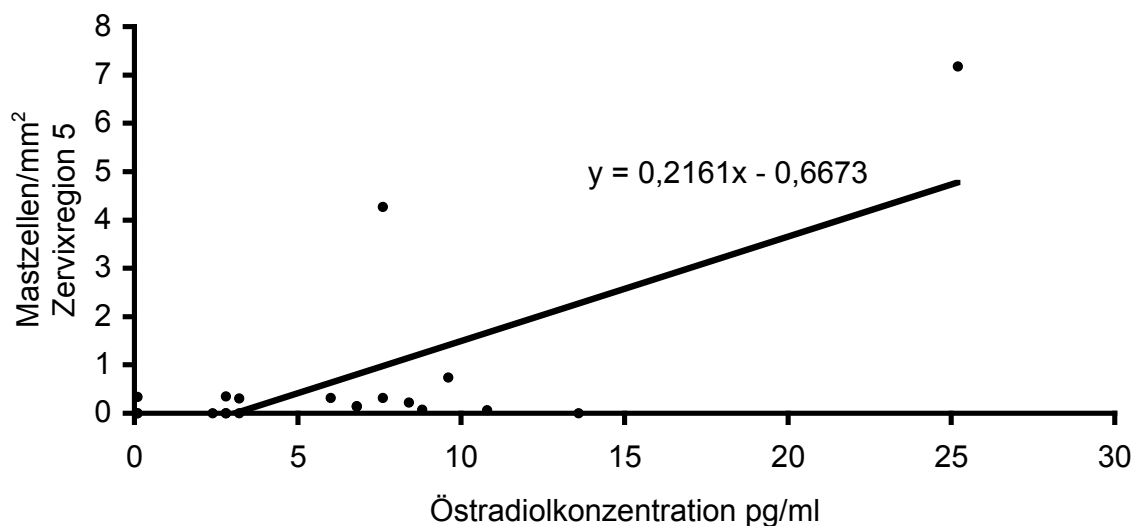


Abbildung 29: Zusammenhang zwischen der Mastzellendichte in der Region 5 der Zervix von Stuten (n = 19) und der Östradiol-17 β -Konzentration im Plasma. Die Korrelation war statistisch signifikant ($r = 0,5$; $p = 0,03$).

4.7.3 Uterus

Mastzellen konnten in acht der 19 Uteri nachgewiesen werden (42,1 %). Die durchschnittliche Zellzahl lag bei diesen acht Proben bei $0,68 \pm 0,72$ (Median 0,42) Zellen/mm². In der Gesamtgruppe ergab sich ein arithmetischer Mittelwert der Mastzellendichte von $0,29 \pm 0,56$ (Median 0) Zellen/mm². Die Mastzellen fanden sich in erster Linie in der *Lamina propria mucosae*.

Die Anzahl an Mastzellen in den Zyklusstadien war unterschiedlich. In der Gruppe der östrischen Tiere konnten keine nachgewiesen werden. Bei den diöstrischen Tieren lag die Mastzellendichte bei $0,33 \pm 0,62$ (Median 0,11) Zellen/mm² und bei den anöstrischen Tieren bei $0,31 \pm 0,59$ (Median 0) Zellen/mm² (Tabelle 40). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden (Tabelle 41).

Tabelle 40: Mastzellendichte im Uterusgewebe von Stuten (n = 19) der verschiedenen Zyklusstadien in Zellen/mm², angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median. Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

	Anöstrus	Diöstrus	Östrus	Gesamt
$\bar{x}_a \pm SA$	$0,31 \pm 0,59$	$0,33 \pm 0,62$	Kein Nachweis	$0,29 \pm 0,56$
Median	0	0,11	Kein Nachweis	0

Tabelle 41: Statistische Unterschiede zwischen der Mastzellendichte im Uterusgewebe von Stuten in den verschiedenen Zyklusgruppen (n = 19). Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

Zyklusgruppe	Zyklusgruppe	p-Wert
Anöstrus	Diöstrus	0,61
Anöstrus	Östrus	0,53
Diöstrus	Östrus	0,33

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Mastzelldichte und den peripheren Hormonkonzentrationen liess sich nicht nachweisen (Tabelle 42).

Tabelle 42: Zusammenhang zwischen den Hormonkonzentrationen und der Mastzelldichte im Uterusgewebe von Stuten (n = 19). Die Korrelationen waren nicht statistisch signifikant.

	Östradiol-17β	Progesteron	Östradiol/ Progesteron- Quotient
Korrelationskoeffizient	0,09	0,34	-0,30
p-Wert	0,70	0,10	0,22

4.7.4 Korrelation der Mastzellen-Dichte in den Genitalorganen

In der Zervix fanden sich bei 18 von 19 Stuten (94,7 %) Mastzellen, wohingegen in der Vagina bei neun (47,4 %) und im Uterus bei acht Individuen (42,1 %) der Mastzellnachweis gelang. Folglich ergab sich im Zervikalgewebe die grösste Dichte an Mastzellen mit $3,72 \pm 7,09$ (Median 1,13) Zellen/mm². In den beiden Organen Vagina und Uterus waren geringere Mastzelldichten zu detektieren (Tabelle 43). Es lag jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Mastzelldichten in den drei Organen vor (Tabelle 44).

Tabelle 43: Durchschnittliche Mastzellzahl/mm² in Vagina, Zervix und Uterus bei Stuten (n = 19). Die Zusammenhänge waren statistisch nicht signifikant.

	Vagina	Zervix	Uterus
$\bar{x}_a \pm SA$	0,59 \pm 1,23	3,72 \pm 7,09	0,29 \pm 0,56
Median	0	1,13	0

Tabelle 44: Darstellung der statistischen Zusammenhänge der Mastzellendichte in Vagina, Zervix und Uterus von Stuten (n = 19) mittels des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r) und des p-Wertes. Es lagen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge vor.

	Vagina	Zervix	Uterus
Vagina		r = 0,29 p = 0,22	r = 0,22 p = 0,37
Zervix	r = 0,29 p = 0,22		r = 0,27 p = 0,26
Uterus	r = 0,22 p = 0,37	r = 0,27 p = 0,26	

4.8 Korrelation zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in den Genitalorganen

Zwischen den Dichten der beiden Zellpopulationen in den Organen Vagina, Zervix und Uterus liess sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der Mastzellendichte im Uterus und dem Grad der Infiltration des vaginalen Gewebes mit eosinophilen Granulozyten nachweisen ($r = -0,44$, $p = 0,045$). Die Stuten mit einer Infiltration des uterinen Gewebes mit Mastzellen wiesen so auch eine Infiltration des vaginalen Gewebes mit eosinophilen Granulozyten auf (Tabelle 45).

Tabelle 45: Statistische Zusammenhänge zwischen der Mastzellendichte und der Dichte eosinophiler Granulozyten in den Genitalorganen Vagina, Zervix und Uterus von Stuten ($n = 19$). Die Korrelation zwischen den Mastzellen im Uterus und der Infiltration mit eosinophilen Granulozyten in der Vagina war statistisch signifikant ($p = 0,005$).

		Mastzellen Zervix	Mastzellen Vagina	Mastzellen Uterus
Eosinophile Granulozyten Zervix	Korrelations- koeffizient	0,25	-0,39	-0,44
	p-Wert	0,30	0,1	0,06
Eosinophile Granulozyten Vagina	Korrelations- koeffizient	0,23	0,28	0,62
	p-Wert	0,35	0,24	0,005
Eosinophile Granulozyten Uterus	Korrelations- koeffizient	0,37	-0,007	0,04
	p-Wert	0,12	0,98	0,88

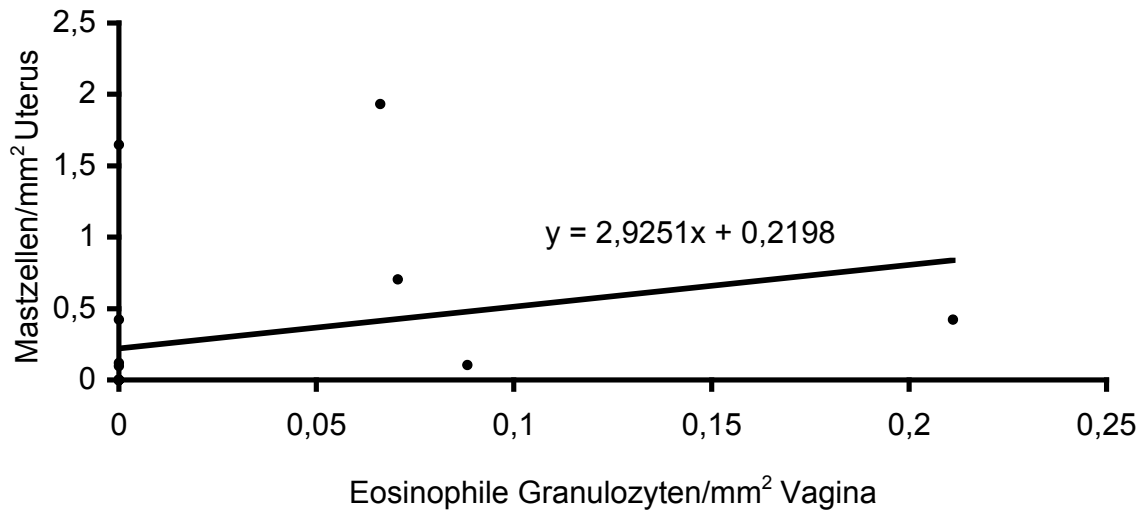


Abbildung 30: Korrelation der Dichte eosinophiler Granulozyten im Vaginalgewebe mit der Mastzell-Dichte im Uterus von Stuten (n = 19). Der Zusammenhang war statistisch signifikant (r = 0,62, p = 0,005)

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Im Gegensatz zum Uterus findet die Zervix bei der klinischen Untersuchung sub- und infertiler Zuchtstuten kaum Beachtung. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die exfoliative Zervikalzytologie als diagnostisches Verfahren in der speziellen gynäkologischen Untersuchung von Zuchtstuten zu etablieren. Im Vergleich zur Endometriumszytologie gibt es kaum wissenschaftliche Untersuchungen über die Zervikalzytologie (Wagner, 1934; Knudsen, 1964; Ricketts, 1982; Card, 2005). Dies ist verwunderlich, da vor allem vom Menschen, aber auch vom Pferd, bekannt ist, dass die Zervix einen bedeutenden Sterilitätsfaktor darstellen kann (Brodauf, 1952; Sweet, 1998; Cicinelli et al., 2005).

Im histologischen Teil der Arbeit wurde das Ziel verfolgt, die Infiltration des equinen zervikalen Bindegewebes mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen zu untersuchen. In der Arbeit von Huchzermeyer (2003) konnte ein Einfluss der Zyklusphasen auf die Dichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen im Zervikalgewebe festgestellt werden. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war aufgrund dessen die Untersuchung der Zellinfiltration im zervikalen Bindegewebe in Abhängigkeit der Plasmakonzentrationen von Östradiol-17 β und Progesteron. Zusätzlich erfolgte in Anlehnung an die Dissertation von Huchzermeyer (2003) der Versuch, histologische Veränderungen definierten Zyklusphasen zuzuordnen.

5.2 Diskussion der Methodik

Es standen Genitaltrakte von vorberichtlich geschlechtsgesunden Stuten ohne Störungen des Allgemeinbefindens zur Verfügung, die direkt nach der Schlachtung gewonnen wurden. Insgesamt konnte auf diese Weise Gewebe von 26 Tieren gesammelt werden.

Obwohl nur klinisch gesunde Schlachtstuten in die Untersuchung aufgenommen wurden, war trotz ordnungsgemäss durchgeführter Schlacht tieruntersuchung nicht auszuschliessen, dass einige Tiere an subklinischen Erkrankungen litten.

Um kranke Tiere zu detektieren, wurde von jeder Stute ein Blutbild angefertigt. Keines der Tiere wies von der Norm abweichende hämatologische Parameter auf (Kraft et al., 2005). Insbesondere eine Eosinophilie sollte ausgeschlossen werden.

Für die zytologischen und histologischen Fragestellungen galten unterschiedliche Einschlusskriterien. Während es für die histologischen Studien notwendig war, alle Stuten mit Hinweisen auf Inflammationen auszuschliessen, galt dies für die zytologischen Studien nicht. Dies liegt darin begründet, dass die exfoliative Zytologie dazu genutzt werden soll, inflammatorische Zustände zu diagnostizieren. In der histologischen Untersuchung sollten jedoch ausschliesslich physiologische hormon- und zyklusabhängige Veränderungen detektiert werden. Bei der makroskopischen Kontrolle auf pathologische Veränderungen an den Geschlechtsorganen waren bei keiner Stute von der Norm abweichende Befunde zu diagnostizieren. Eine Stute mit subklinischer Endometritis konnte in der zytologischen Untersuchung detektiert werden, weshalb sie nicht in die histologische Untersuchung aufgenommen wurde.

Neben der Untersuchung des potentiellen Einflusses der peripheren Hormonkonzentrationen auf die histologischen Parameter wurde der Zusammenhang zu den Zyklusphasen analysiert. Primär wurde das Ziel verfolgt, anhand des makroskopischen Zustandes des Uterus und der Ovarien eine Zyklusansprache durchzuführen. Es erfolgte zunächst die Erhebung der adspektorischen und palpatorischen Ovar- sowie Uterusbefunde. Dies entspricht dem Vorgehen in der Praxis am lebenden Tier (Handler, 2005). Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Hormonanalysen zur zyklischen Einordnung der Stuten herangezogen. Fünf Stuten waren anhand ihrer Hormonkonzentrationen nicht eindeutig einem Zyklusstadium zuzuordnen (siehe 3.4). Daher fanden diese Tiere weder bei der Berechnung des potenziellen Zusammenhanges zwischen Zellinfiltration und Hormonkonzentration noch bei den Berechnungen der unterschiedlichen Zellinfiltration in den Zyklusstadien Berücksichtigung. Diese Umstände führten zu einer Gruppengrösse von $n = 2$ bei den östrischen Tieren. Diese kleine Gruppengrösse ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten.

Zytologische Untersuchung

Für die zytologische Untersuchung standen die Zervikal- und Endometriumszytologien von 26 Stuten zur Verfügung. Bei der Betrachtung des hormonellen Einflusses auf die Zytologien fanden nur Stuten mit Hormonkonzentrationen, die einem physiologischen Zyklusverlauf entsprechen, Berücksichtigung. Dies reduzierte die Zahl auf 21 Tiere.

Es liegt eine Vielzahl von Untersuchungen zur Durchführung und Interpretation exfoliativer Endometriumszytologien in der Literatur vor (Wagner, 1934; Knudsen, 1964; Ricketts, 1982; Card, 2005). Die Methodik der Zellentnahme und der Färbung konnte daher übernommen werden. Die Ansprache der Zervikalzellen erfolgte nach den Vorgaben von Lauer (1977). Der Autor gibt eine eindeutige Beschreibung von Zervikalzellen, die eine Abgrenzung von den Endometriumszellen und Entzündungszellen erlaubt.

In der Literatur finden sich sehr differente Beurteilungskriterien für die Auswertung exfoliativer Endometriumszytologien (Brook, 1992). Dabei sind zwei grundsätzlich unterschiedliche Vorgehensweisen zu differenzieren:

1. Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld
2. Verhältnis neutrophiler Granulozyten zu exfoliierten Genitalepithelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde entschieden, eine Kategorisierung der Befunde nach der ersten Methodik durchzuführen, da sich diese in der praktischen Durchführung bewährt hat (Reinemund, 1988).

Histologische Untersuchung

Für die histologische Untersuchung standen von den ursprünglich 26 Tieren 19 Stuten zur Verfügung. Die Reduktion ergab sich dadurch, dass Stuten mit zytologisch nachgewiesener Inflammation, mit Überschreitung der Altersgrenze von ≥ 30 Jahren und Östradiol-17 β - und Progesteronkonzentrationen, die sich keinem Zyklusstadium zuordnen liessen (siehe 3.4), ausgeschlossen wurden ($n = 7$).

Diese strengen Ausschlusskriterien waren notwendig, um ein möglichst gesundes Kollektiv zu erhalten. Sowohl altersabhängige Veränderungen, als auch hormonelle Imbalancen müssen als potenzielle Einflussfaktoren auf die Histomorphologie der Geschlechtsorgane angesehen werden (Ricketts und Alonso, 1991).

Zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten wurde die Sirius-Red-Färbung gewählt. Es sind auch immunhistologische Methoden zum Nachweis eosinophiler Granulozyten beschrieben. Schubert (1998) wandte eine Immunhistochemie mit Antiserum gegen das Major Basic Protein (MBP) aus den Granula der eosinophilen Granulozyten an. Hier stellte sich jedoch das Problem einer Beeinflussung der Permeabilität der Eosinophilen-Membran durch Alkohol enthaltende Fixationslösungen, wodurch auch MBP im umliegenden Gewebe nachgewiesen werden konnte. Die Sirius-Red-Färbung hingegen ist beim Pferd evaluiert (Wehrend et al., 2004b) und in vorherigen Untersuchungen in ähnlicher Fragestellung eingesetzt worden (Wehrend et al., 2005), weswegen auf diese Nachweismethode zurückgegriffen wurde. Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich die Eignung dieser einfachen Färbemethode. Um ein Kontrollorgan für die lichtmikroskopische Eosinophilendarstellung zu gewinnen, wurden die somatischen Organe Leber, Milz und Dünndarm untersucht. In den Dünndarm-Proben liess sich bei jeder Stute eine hochgradige Infiltration mit eosinophilen Granulozyten nachweisen, was auch in der Literatur beschrieben ist (Rötting et al., 2006). Aus diesem Grund wurde der Dünndarm als Kontrollorgan gewählt und bei jedem Färbedurchgang mitgeführt.

Wie in der Literatur beschrieben lassen sich Mastzellen mittels der Toluidin-Blau-Färbung eindeutig darstellen (Galeotti et al., 1997). Die metachromatische Anfärbung der Mastzellgranula ist auf ihren Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen, Heparin, Chondroitin- und Dermatansulfat zurückzuführen (Galeotti et al., 1997; Welle et al., 1997; Gunin und Sharov, 1998; Huchzermeyer, 2003). Der Nachweis von Mastzellen mittels immunhistologischer Darstellung der Tryptase- oder Chymaseaktivität hat den Nachteil, dass nicht alle Subpopulationen der Mastzellen eine Aktivität dieser Enzyme besitzen. So konnten bei histologischen Untersuchungen am Endometrium von Stuten keine Mastzellen mit Chymase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Zahl der Mastzellen, die sich mittels metachromatischer Anfärbung darstellen liessen, war in dieser Untersuchung

statistisch signifikant höher im Vergleich zu dem immunhistochemischen Nachweis (Welle et al., 1997). Im Gegensatz hierzu schnitt beim Menschen die Methode der Tryptase-Immunlokalisation im Vergleich zu den histologischen Färbemethoden besser ab (Jeziorska et al., 1995).

Auch für diese Zellpopulation stellte sich der Dünndarm als ideales Kontrollorgan heraus. In der Leber konnten nur bei zwei Stuten Mastzellen detektiert werden, alle Milzpräparate waren ohne Mastzellnachweis.

Da Huchzermeyer (2003) regionale Unterschiede in der Zellinfiltration des Bindegewebes entlang des *Canalis cervicalis* aufzeigen konnte, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine analoge Unterteilung der Zervix entlang der Längsachse in fünf Regionen von cranial nach caudal (R1 – R5). Zusätzlich wurden vaginale und uterine Proben untersucht, um die Frage zu beantworten, ob sich die in der Zervix gewonnenen Ergebnisse auch in anderen Organen des Geschlechtstraktes widerspiegeln.

Die histologischen Schnitte liessen sich anhand der Gewebsarchitektur eindeutig den Organen zuordnen. Fehlinterpretationen des uterusnahen Teiles der Zervix als Uterus und umgekehrt sind daher auszuschliessen.

5.3 Zyklusdiagnostik

Die Östrusdetektion bei der Stute findet in praxi durch das Abprobieren der Stute am Hengst und die gynäkologische Untersuchung durch den Tierarzt statt. Ein Abprobieren der Stuten war im Rahmen dieser Untersuchung auf dem Schlachthof nicht möglich, so dass ausschliesslich die makroskopischen Befunde an den Ovarien und dem Uterus sowie die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Östradiol-17 β und Progesteron zur Verfügung standen.

Ein Vergleich dieser beiden Zuordnungskriterien zeigte, dass die ausschliessliche Beurteilung der makroskopischen Befunde nur in 42,3 % mit den Ergebnissen der Hormonanalysen übereinstimmte. So waren sechs Stuten anhand der makroskopischen Befunde dem Zyklusstadium des Östrus zuzuordnen, was jedoch nur bei zwei Tieren auch mittels der Hormonanalysen bestätigt werden konnte. Vier Stuten wiesen zwar Follikeldurchmesser über 3 cm und einen ödematisierten Uterus auf, hatten jedoch keine dem Östrus entsprechenden Konzentrationen an Östradiol-17 β und Progesteron im peripheren Blut. Dies könnte teilweise in den Follikelbildungsphasen während des Diöstrus begründet liegen. Etwa fünf Tage nach der Ovulation kommt es zur Selektion eines dominanten Follikels, der in der Regel atresiert, jedoch vereinzelt auch zur Ovulation kommt (Rödiger und Bostedt, 2004). Nur zwei der neun diöstrischen Stuten konnten anhand der makroskopischen Befunde eingeordnet werden. Dies lässt sich aufgrund der erschwerten palpatorischen Ansprache des *Corpus luteums* beim Pferd erklären, weswegen auch in der Praxis zur Diagnostik eines aktiven *Corpus luteums* Hormonanalysen durchgeführt werden (Schnurrbusch und Vogler, 2002). Fünf Stuten liessen sich keinem Zyklusstadium zuordnen, da bei ihnen beide Hormonkonzentrationen über Basalniveau lagen. Ursache hierfür könnte Restgelbkörpergewebe oder ein *Corpus luteum persistens* sein. Diese können zu protrahierten Rosseverläufen oder einer verzögerten Follikelentwicklung führen (Lack und Huchzermeyer, 2004). Auch im Rahmen asynchroner Doppelovulationen liessen sich derartige Hormonkonzentrationen erklären (Hohenhaus und Bostedt, 1990).

Aus den vorliegenden Resultaten lässt sich schliessen, dass aufgrund makroskopischer Ergebnisse keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die hormonelle Lage gezogen werden können. Im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen ist daher die Durchführung von Hormonanalysen zur exakten Zyklusdiagnostik unverzichtbar.

5.4 Exfoliative Zytologien

Die physiologische und pathologische Bedeutung der equinen Zervix für die Fortpflanzungsleistung ist kaum untersucht. Bisher wird die Zervix im Rahmen von gynäkologischen Erkrankungen beim Pferd nur bei der Pathogenese der equinen Pyometra sowie bei Missbildungen diskutiert (Blanchard, 1982; Wehrend und Thumes, 2000; Wehrend et al., 2001). Abgesehen von anatomischen Anomalien wird über die Rolle der Zervix bei infertilen Zuchtstuten kaum berichtet (Brodauf, 1952).

Die diagnostischen Verfahren an der Zervix im Rahmen der zuchthygienischen Untersuchung sind sehr beschränkt (Götze, 1949; LeBlanc, 1992; Handler, 2005). Die Erkennung subklinischer, entzündlicher Veränderungen ist mit den bisherigen Untersuchungstechniken nicht möglich.

Im Gegensatz dazu hat sich die exfoliative Endometriumszytologie im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung zur weiterführenden Diagnostik am Uterus bewährt (Lauer, 1977; Tillmann und Meinecke, 1980; Knudsen, 1982; Asbury, 1984; Couto und Hughes, 1984; Slusher et al., 1984; Brook, 1985; La Cour und Sprinkle, 1985; Ball et al., 1988; Reinemund, 1988; Roszel und Freeman, 1988; Brook, 1992; Wehrend et al., 2004c; Card, 2005). Sie gestattet die schnelle Diagnose subklinischer und klinischer inflammatorischer Veränderungen, wie beispielsweise der *Endometritis sicca*. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Methodik der Endometriumszytologie problemlos auf die Zervikalzytologie zu übertragen ist.

Die neutrophilen Granulozyten liessen sich mit der angewandten Methode in der Zervikalzytologie eindeutig darstellen. So gelang in der relativ kleinen Population von 26 vorberichtlich geschlechtsgesunden Stuten der Nachweis einer Zervizitis bei einer Stute, die makroskopisch nicht zu erkennen war. Diese Stute wies sowohl in der Zervikal- als auch in der Endometriumszytologie deutlich erhöhte Gehalte an neutrophilen Granulozyten auf. Beide Werte (Endometriumszytologie 10,7 und Zervikalzytologie 6,4 Zellen pro Gesichtsfeld) fallen in einen Bereich, der als pathologisch zu werten ist (siehe 2.9, Tabelle 2). Prinzipiell kann davon ausgegangen werden, dass die für die Endometriumszytologie zahlreich vorhandenen Referenzwerte, als vorläufige Richtwerte auf die Zervikalzytologie übertragen werden können. Zur Ermittlung exakter Referenzwerte sollten jedoch weitere Untersuchungen angeschlossen werden. Erstmalig besteht mit Hilfe der in

dieser Studie beschriebenen Methodik, die Möglichkeit der Diagnostik subklinischer, entzündlicher Veränderungen der equinen Zervix.

Bei drei Stuten konnten neutrophile Granulozyten in der Zervikalzytologie nachgewiesen werden, die jedoch unterhalb der Dichte lagen, welche zur Diagnose einer Zervizitis geführt hätte. Bei keinem dieser drei Tiere gelang der Nachweis neutrophiler Granulozyten in der Endometriumszytologie. Bei zwei Stuten fanden sich selektiv in der Endometriumszytologie neutrophile Granulozyten. Statistisch liess sich keine Korrelation zwischen dem Vorkommen neutrophiler Granulozyten in Zervikal- und Endometriumszytologie nachweisen ($r = 0,36$, $p = 0,07$). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Zervix im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung als eigenständiges Organ zu betrachten ist und nicht nur im Rahmen generalisierter entzündlicher Veränderungen im Genitaltrakt eine Rolle spielt.

Im Gegensatz zum Haussäugetier ist die Rolle der Zervix im Rahmen der Infertilität beim Menschen relativ gut untersucht. So soll bei 5 % der infertilen Paare die Zervix der Frau die Causa darstellen. Frauen mit einer Infertilität aufgrund des „zervikalen Faktors“ weisen eine signifikant höhere Inzidenz einer asymptomatischen zervikovaginalen Leukozytose auf (Wah et al., 1999). Beim Menschen ist der Grund für diese Anhäufung von Entzündungszellen im Zervikalkanal ohne klinische Symptomatik meist eine Infektion mit Chlamydien oder Trichomonaden, wobei auch andere Organismen wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Bacillus subtilis* eine Rolle spielen können (Kiviat et al., 1985; Ou und Su, 2000). Eine Behandlung dieser Patienten mit Breitbandantibiotika erhöhte die Konzeptionsrate um 64 % (Ou und Su, 2000).

Die Zervizitis bei der Stute ist häufig mit einer Vaginitis und/oder Endometritis assoziiert. Organismen wie β -hämolyisierende Streptokokken, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* können für eine Zervizitis bei der Stute verantwortlich sein. Auch nichtinfektiöse irritierende Substanzen wie aspirierte Luft, Urin oder intrauterin applizierte Antibiotika und Antiseptika können zu einer Zervizitis führen (Sertrich, 1992).

Meist werden entzündliche Veränderungen der Zervix bei der Stute im Zusammenhang mit der kontagiösen equinen Metritis (CEM) beschrieben. Diese Infektion mit *Taylorella equigenitalis* tritt in der Regel nach einer Ansteckung durch den Deckakt auf. Die klinische Phase beginnt nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Tagen und

hält meist 1 bis 2 Wochen an. Neben der Zervizitis tritt teilweise auch eine Vaginitis und Endometritis mit grauem, undurchsichtigem, mucopurulentem bis serösem Ausfluss auf. Mildere Formen treten mit wenig Ausfluss und Zyklusstörungen in Erscheinung. Nach Überstehen der Erkrankung bleiben Stuten zum Teil über mehrere Monate Keimträger (Selbitz, 2002).

Es stellt sich die Frage, inwieweit sich eine Infektion mit *Taylorella equigenitalis* in der Zervikalzytologie nachweisen lässt. Interessant wäre vor allem auch, ob sich bei Tieren mit überstandener Infektion, die noch Keimträger sind, Hinweise hierfür in der zellulären Zusammensetzung der Zervikalzytologie finden lassen.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Zervikalzytologien mit denen der Endometriumszytologien fällt auf, dass die Zervikalzellen deutlich weniger exfolieren als die Endometriumszellen. So finden sich in den Zytologien der Zervix mehr Endometriumszellen ($7,14 \pm 7,10$) als Zervikalzellen ($1,57 \pm 2,58$), was als Ausdruck der transzervikalen uterinen Clearance zu werten ist. Hypothetisch kann dieser Umstand dadurch erklärt werden, dass das Endometrium eine weitaus grössere Oberfläche besitzt als die Zervix. Daher ist es möglich, dass pro Zeiteinheit mehr Endometriumszellen als Zervikalzellen exfolieren.

Die Gesamtzellzahlen in der exfoliativen Zervikal- und Endometriumszytologie zeigten einen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p = 0,009$). Mechanismen, die zu einer verstärkten Exfoliation von Endometriumszellen führen, scheinen auch in der Zervix wirksam zu sein. Welcher Natur diese sind, war in der vorliegenden Studie nicht zu erfassen. Beim Menschen ist beispielsweise nachgewiesen worden, dass Rauchen die Exfoliation des zervikovaginalen Epithels beschleunigt (Basu et al., 1992).

Ein Einfluss der Hormonkonzentrationen auf die Gesamtzellzahl in den Zytologien konnte nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der Untersuchung von Britton (1982), bei der ebenfalls keine Beeinflussung der Zellzusammensetzung zerviko-endometrialer Zytologien durch das Zyklusstadium detektiert werden konnte.

Es lag eine statistisch signifikante Beeinflussung der Zahl neutrophiler Granulozyten in den Zervikalzytologien durch die Progesteronkonzentration im Plasma vor. Mit steigender Progesteronkonzentration nahm die Zahl neutrophiler Granulozyten ab ($r = -0,47$; $p = 0,03$). Die Ursache für diese Beobachtung liegt wohl darin begründet,

dass mit steigenden Progesteronkonzentrationen die Abwehrleistung der Genitalschleimhäute abnimmt (Brook, 1992; Scheibl und Zerbe, 2000). In einer Studie an ovariectomierten Stuten mit experimenteller intrauteriner *Streptococcus zooepidemicus*-Infektion konnte dieser hormonelle Einfluss auf die Abwehrleistung des Endometriums belegt werden (Ganjam et al., 1980). Östrogenbehandelte Tiere wiesen nach einer Woche keine Bakterien mehr im *Cavum uteri* auf, während bei Stuten ohne Hormonapplikation dieser Zustand erst nach zwei Wochen erreicht wurde. Bei progesteronbehandelten Stuten gelang ein Keimnachweis über den gesamten Versuchszeitraum von fünf Wochen. Im Vergleich zu den progesteronbehandelten wiesen die östrogenbehandelten Tiere eine deutliche Steigerung der Phagozytoseaktivität der polymorphkernigen Leukozyten auf. Auch beim Schaf und Schwein ist belegt, dass Progesteron die Fähigkeit des Uterus, bakterielle Infektionen abzuwehren, reduziert (Lewis, 2003; Wulster-Radcliffe et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen den Schluss zu, dass Progesteron auf die Abwehrleistung der Zervix einen ähnlichen Einfluss hat wie auf die des Endometriums. Ein statistisch signifikanter Einfluss der Progesteronkonzentration auf die Zahl neutrophiler Granulozyten in der Endometriumszytologie liess sich in dieser Studie nicht nachweisen ($r = -0,10$; $p = 0,68$). Dies könnte in der besonderen Funktion der Zervix als Barriere der Keimaszension begründet liegen. Klein et al. (2006) stellten fest, dass die Zervix die wichtigste Barriere gegen die Aszension pathogener Keime in den Uterus darstellt. Beim Menschen ist die Zervix die Hauptlokalisation der zellvermittelten Immunität (Pudney et al., 2005).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die exfoliative Zervikalzytologie ein vielversprechendes neues diagnostisches Verfahren für die Untersuchung von Zuchtstuten darstellt. Dabei erweist sich die in der Endometriumszytologie eingesetzte Methodik als hundertprozentig übertragbar. Die Entnahme der Proben sollte auf jeden Fall unter Sichtkontrolle mittels Spekulum erfolgen, um eine versehentliche intrauterine Probenentnahme zu vermeiden. In diesem Fall dürften sich in der Zytologie keine Zervikalzellen befinden. Zusätzlich lässt sich durch die Probenentnahme mittels Polanski-Spekulum zeitgleich eine Adspektion der Vaginal- und Zervikalschleimhaut vornehmen. Bei unkooperativen Tieren besteht auch die Möglichkeit der manuellen Entnahme (Walter et al., 2006).

5.5 Histologische Untersuchungen

5.5.1 Eosinophile Granulozyten und Mastzellen in den Kontrollorganen

Der Nachweis eosinophiler Granulozyten gelang regelmässig in Leber, Milz und Dünndarm. Mastzellen waren nur im Darm kontinuierlich darzustellen. In der Leber fanden sich bei zwei Stuten Mastzellen und in der Milz waren keine Mastzellen nachweisbar.

Das Vorkommen eosinophiler Granulozyten und Mastzellen im Darm von Pferden wird in der Literatur regelmässig beschrieben (Collobert-Laugier et al., 2002; Packer et al., 2005). Auch in der vorliegenden Studie liessen sich sowohl eosinophile Granulozyten als auch Mastzellen mit der höchsten Dichte und Regelmässigkeit im Darm nachweisen, so dass dieses Organ als Kontrollorgan gewählt wurde.

Im Dünndarm lag die Dichte eosinophiler Granulozyten bei $108,5 \pm 70,86$ Zellen/mm². Dies deckt sich mit den Angaben aus der Literatur, in denen Dichten im Dünndarm von 100 bis 300 Zellen/mm² beschrieben wurden (Rötting et al., 2006).

5.5.2 Eosinophile Granulozyten in den Geschlechtsorganen

Im Vaginalgewebe von Stuten liessen sich nur in 21,1 % sowie im Uterusgewebe in 31,6 % der Fälle eosinophile Granulozyten nachweisen. Im Gegensatz hierzu gelang der Nachweis dieser Zellpopulation in der equinen Zervix in 94,7 %. Nur bei einer Stute konnten keine eosinophilen Granulozyten in der Zervix detektiert werden. Statistisch bestand kein Zusammenhang zwischen der Zellinfiltration in der Zervix, der Vagina und dem Uterus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zervix eigenen steuernden Mechanismen unterworfen ist. Weiterhin bestätigen sie die Resultate vorangegangener Untersuchungen, die besagen, dass eosinophile Granulozyten zur physiologischen Zellpopulation der equinen Zervix gehören (Wehrend et al., 2005).

In dieser Vorgängerarbeit konnten unterschiedliche Zelldichten eosinophiler Granulozyten entlang des *Canalis cervicalis* nachgewiesen werden, die jedoch nicht statistisch signifikant waren. Auch in der vorliegenden Arbeit lagen nicht signifikante, regionale Unterschiede vor. Die höchsten Zelldichten fanden sich in der uterusnahen

Region der Zervix ($R1 = 1,1 \pm 3,2$ Zellen/ mm^2), nach caudal zur *Portio vaginalis cervicis* nahmen die Zelldichten kontinuierlich ab ($R5 = 0,06 \pm 0,11$ Zellen/ mm^2).

Die Bedeutung der erhöhten Dichte von Abwehrzellen am Uteruseingang könnte in einer gesteigerten Abwehrleistung dieser Region begründet liegen. So konnte sowohl bei der Kuh als auch bei der Stute eine Reduktion von Bakterien entlang der Längsachse des Geschlechtsapparates von der Vagina bis zum Uterus nachgewiesen werden (Huchzermeyer et al., 2002; Wehrend et al., 2003). Im Bereich der Zervix kommt es vor allem zu einer Reduktion der fakultativ pathogenen Keimarten (Klein et al., 2006).

Bei Betrachtung der Dichte eosinophiler Granulozyten der Zervix in den unterschiedlichen Zyklusstadien fällt auf, dass die eosinophilen Granulozyten im Östrus 22-fach höhere Dichten ($13,35 \pm 0,21$ Zellen/ mm^2) als bei diöstrischen Tieren ($0,59 \pm 1,37$ Zellen/ mm^2) aufwiesen. Im Vergleich zur Gruppe der anöstrischen Tiere ($0,31 \pm 0,28$ Zellen/ mm^2) ist die Dichte im Östrus 43-fach erhöht. Diese Unterschiede sind aufgrund der enormen Differenz, trotz der geringen Gruppengrösse bei den östrischen Tieren ($n = 2$), statistisch signifikant ($p = 0,04$). In den fünf einzelnen Regionen der Zervix liegen zwischen Diöstrus und Östrus nur in der cranialsten ($R = 1$) und der caudalsten Region ($R = 5$) der Zervix statistisch signifikante Differenzen vor ($p = 0,04$). Zwischen Anöstrus und Östrus sind alle Regionen ausser Region 2 statistisch signifikant unterschiedlich ($p = 0,04$).

Dies bestätigt die Ergebnisse von Huchzermeyer (2003), die ebenfalls eine gesteigerte Infiltration der Zervix mit eosinophilen Granulozyten im Östrus beobachten konnte, was damals jedoch nicht statistisch zu belegen war. Dies könnte zum einen darin begründet liegen, dass die östrischen Stuten in dieser Studie nur einen vierfachen Anstieg der Dichte eosinophiler Granulozyten aufwiesen (Östrus: $5,93$ Zellen/ mm^2 ; Diöstrus: $1,44$ Zellen/ mm^2). Desweiteren wurden in der oben genannten Studie keine Hormonanalysen zur Zyklusansprache durchgeführt, was nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung zu einer ungenaueren Zuordnung in die Zyklusgruppen führt.

Eine Erklärung für diese Resultate lässt sich auch durch weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit finden. Bedingt durch steigende Östradiol- 17β -Konzentrationen kommt es zu einer Einwanderung eosinophiler Granulozyten ins zervikale Gewebe.

Im Gegensatz hierzu führt eine steigende Progesteronkonzentration zu einem Absinken der Eosinophilendichte in der Zervix der Stute. In der kompletten Zervix (alle fünf Regionen) waren diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant zu belegen. Bei differenzierter Betrachtung des hormonellen Einflusses auf die Eosinophilendichte in den einzelnen Regionen, findet sich in Region 2 eine statistisch signifikante Abhängigkeit vom Östradiol/Progesteron-Quotienten ($r = 0,52$, $p = 0,02$), jedoch nicht von der Östradiol-17 β - und Progesteronkonzentration allein. Dies zeigt, dass beide Hormone einen Einfluss auf die Eosinophilendichte aufweisen und sich in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen.

Bei mehreren Tierarten konnte bereits nachgewiesen werden, dass es bei steigenden Östrogenkonzentrationen zu einer Infiltration der Geschlechtsorgane mit eosinophilen Granulozyten kommt (Bassett, 1962; Tchernitchin et al., 1974; Tchernitchin et al., 1975; Matsuda et al., 1983; Katayama et al., 1998; Ramos et al., 2000). An der Zervix konnte dies bisher nur bei der Kuh, der Ratte und dem Menschen *intra partum* beobachtet werden (Knudsen, 1996; Luque et al., 1996; Knudsen et al., 1997; Wehrend et al., 2004a). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung erweitern diese Erkenntnisse somit um die Tierart Pferd.

Es liegen unterschiedliche Theorien für diesen Östrogeneinfluss auf die Migration eosinophiler Granulozyten vor. Zunächst wurde vermutet, dass eosinophile Granulozyten Östrogenrezeptoren exprimieren, die für die Lokalisation eosinophiler Granulozyten in der Uteruswand verantwortlich sind (Lyttle et al., 1984; Lyttle et al., 1989). Tchernitchin et al. (1985) konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Degranulation eosinophiler Granulozyten unter dem hormonellen Einfluss von Östradiol-17 β beobachten. Markaverich et al. (1986) stellten hingegen fest, dass die Uterusmuskulatur selbst die primäre Lokalisation der Östrogenrezeptoren ist.

Giembycz und Lindsay (1999) beschrieben zirka 30 verschiedene chemische Lockstoffe für eosinophile Granulozyten aus den Gruppen der Lipide, Peptide, Zytokine, CC-Chemokine, CXC-Chemokine und der Lectine. Inzwischen bestehen Theorien über chemotaktische Faktoren wie Komplement C3 oder Cyclophilin, die im Uterus unter Östrogeneinwirkung freigesetzt werden und die Migration eosinophiler Granulozyten bedingen (Leiva et al., 1991; Xu et al., 1992). Schon Lee et al. (1989) vermuteten, dass der östrogen-stimulierte Influx von eosinophilen Granulozyten in

den Ratten-Uterus durch eine Östrogenrezeptor vermittelte Synthese, Modifikation oder Freisetzung eines Proteins bedingt wird. Östron und Östriol zeigten ebenfalls eine chemotaktische Wirkung, die jedoch geringer ausfiel als die des Östradiol-17 β . Durch das Antiöstrogen Tamoxifen sowie durch RNA- und Proteinsynthese-Inhibitoren konnte die chemotaktische Wirkung des Östradiols auf die eosinophilen Granulozyten aufgehoben werden. Dies bestärkte die Theorie, dass es sich bei dem Eosinophilen-Chemotaxis-Faktor des Uterus (ECF-U) um ein Protein handeln muss (Lee et al., 1989). Nach Isolierung und Charakterisierung der uterinen Proteine, die eosinophile Chemoaktivität aufweisen, konnte durch eine Aminosäuresequenzanalyse Cyclophilin als eines dieser Moleküle identifiziert werden (Xu et al., 1992). Nichtsdestotrotz gibt es bisher keinen endgültigen Beweis, dass Cyclophilin für die eosinophile Invasion essentiell ist (Gouon-Evans und Pollard, 2001).

Durch Untersuchungen an Uteri von Eotaxin-defizienten Mäusen konnte dagegen Eotaxin als unerlässliches, östrogeninduziertes Chemokin für die Besiedelung des Uterus mit eosinophilen Granulozyten angesprochen werden (Gouon-Evans und Pollard, 2001). Die Applikation von Östrogenen an ovariectomierte Ratten führte zu einem dramatischen Anstieg der Eotaxin-mRNA im Uterus. Im Proöstrus, wenn die Invasion der eosinophilen Granulozyten beginnt, konnte sowohl Eotaxin als auch seine mRNA im Uterus der Mäuse nachgewiesen werden (Gouon-Evans und Pollard, 2001). Die Bedeutung dieses Proteins für die Eosinophileninfiltration in die Darmmukosa beim Pferd ist ebenfalls bewiesen (Matthews et al., 1998; Benarafa et al., 2000).

Eotaxin gehört zur Familie der C-C Chemokine und wurde ursprünglich als chemotaktisches Agens für eosinophile Granulozyten in der Lunge von Meerschweinchen nachgewiesen (Jose et al., 1994). Bei Eotaxin könnte es sich tatsächlich um den schon von Lee et al. (1989) postulierten ECF-U handeln, da das Molekulargewicht des Mäuse-Eotaxin bei 17 kDa liegt, womit es dem Molekulargewicht des ECF-U bei der Ratte mit 20 kDa sehr nahe kommt (Gouon-Evans und Pollard, 2001).

Hornung et al. (2000) stellten fest, dass Eotaxin beim Menschen von den Epithelzellen des Endometriums gebildet wird und die Bildung während des Zyklus variiert. Auffällig ist, dass bei Frauen mit Endometriose die Sekretion von Eotaxin verstärkt ist.

Da es sich bei Cyclophilin um eine Peptidyl-Propyl-Isomerase handelt, die als Chaperone agieren kann (Fischer et al., 1998), könnte es sein, dass Cyclophilin und Eotaxin miteinander agieren (Gouon-Evans und Pollard, 2001).

Im Gegensatz zu den Östrogenen besitzt Progesteron einen inhibitorischen Effekt auf die Infiltration des zervikalen Bindegewebes mit eosinophilen Granulozyten bei der Ratte (Luque et al., 1996; Ramos et al., 2000). Ramos et al. (2000) wiesen nach, dass durch Progesteron die östrogenbedingte Invasion des zervikalen Bindegewebes der Ratte mit eosinophilen Granulozyten geblockt wird. Durch die Applikation des Antigestagens RU-486 wurde dieser Block wieder aufgehoben und die Östrogene konnten ihre volle Wirkung entfalten. Ähnliche Ergebnisse lieferte Schubert (1998), der durch die Applikation des Progesteron-Antagonisten Onapristone eine ähnliche Infiltration des Rattenuterus mit eosinophilen Granulozyten erreichte, wie durch die Verabreichung von Östrogen. Durch diese suppressive Beeinflussung eosinophiler Granulozyten bestand auch hier der Verdacht, dass diese einen klassischen Progesteron-Rezeptor besitzen, was jedoch nicht bestätigt werden konnte (Aerts et al., 2002).

Wehrend et al. (2004a) konnten eine intrapartale Infiltration des zervikalen Gewebes mit eosinophilen Granulozyten beim Rind nachweisen, beim Schaf hingegen gelang dies nicht. Die Autoren vermuteten als Ursache hierfür die im Vergleich zum Rind hohen intrapartalen Progesteronkonzentrationen beim Schaf. Diese könnten die Infiltration der Zervix mit eosinophilen Granulozyten supprimieren. Am fünften und zehnten Tag *post partum*, bei basalen Progesteronkonzentrationen, konnte dann auch beim Schaf eine Infiltration des vaginalen und zervikalen Gewebes mit eosinophilen Granulozyten beobachtet werden (Klein et al., 2004).

Mit diesen in der Literatur beschriebenen Zusammenhängen lässt sich erklären, dass sich eine statistische Abhängigkeit nur vom Östradiol/Progesteron-Quotienten nachweisen liess, und nicht von der Östradiol-17 β - oder der Progesteronkonzentration alleine.

Eosinophile Granulozyten besitzen ein vielfältiges Aufgabenfeld im Organismus. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Immunität gegen Parasiten. Ebenso wird ihnen zugesprochen, ein Faktor in der Bekämpfung von respiratorischen Pathogenen zu sein. Sie sind mit den Haupteffektorzellen im Rahmen entzündlicher Prozesse, die der

Pathogenese allergischer Erkrankungen zu Grunde liegen (Walsh et al., 2003). Bei der Antigenpräsentation zur Stimulation von CD4⁺ T-Helferzellen sind sie ebenfalls beteiligt (MacKenzie et al., 2001).

Eosinophile Granulozyten speichern ein weites Spektrum pro-inflammatorischer Mediatoren. Darunter finden sich die vier kationischen Granulaproteine Major Basic Protein, eosinophiles kationisches Protein, eosinophile Peroxidase und eosinophil-derived Neurotoxin. Eosinophile Granulozyten synthetisieren ebenfalls Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die zum grossen Teil in ihren Granula gespeichert werden (Jain, 1993 a).

Im Vordergrund der Funktion der eosinophilen Granulozyten steht ihre proinflammatorische Aktivität, die in den chemotaktischen, kollagenolytischen und zytotoxischen Wirkungen der Granulainhaltsstoffe begründet ist. Weiterhin besitzt diese Zellart auch antiinflammatorische Eigenschaften. So haben eosinophile Granulozyten die Fähigkeit, Immunkomplexe und Mastzellgranula zu phagozytieren und die ödematisierende Wirkung von Serotonin und Bradykinin aufzuheben. Zink aus eosinophilen Granulozyten hemmt die Freisetzung von Histamin, Serotonin und *platelet activating factor* aus den Mastzellgranula und mittels Histaminase können sie freies Histamin inaktivieren (Jain, 1993 a). Diese entzündungsregulierenden Eigenschaften könnten in der Zervix während des Östrus ebenfalls von Bedeutung sein. Durch die Öffnung des Zervikalkanals während des Östrus und den Deckakt besteht die Gefahr von Infektionen des Geschlechtstraktes. Die Aufgabe eosinophiler Granulozyten könnte unter diesen Gesichtspunkten in einer Infektionsabwehr mit Regulation des entzündlichen Geschehens liegen. Diese Theorie wird durch eine Studie von Saltiel et al. (1987) bekräftigt, in der die Zahl eosinophiler Granulozyten in Zervix und Uterus postpartaler Stuten korrelierend zur Bakterienzahl abnahm.

Als weitere Funktion der eosinophilen Granulozyten in der Zervix steht die Beteiligung an Um- und Abbauprozessen des Bindegewebes zur Diskussion. Es liegen zahlreiche Studien über den erweichenden, kollagenolytischen Einfluss von Östrogenen auf das zervikale Bindegewebe vor (Gordon und Calder, 1977; Liggins, 1978; Wallis und Hillier, 1981; Luque et al., 1996; Ramos et al., 2000).

Knudsen und Mitarbeiter (1997) verbinden den Eosinophileneinstrom im peripartalen Zeitraum mit einer gesteigerten Kollagenolyse. Humane eosinophile Granulozyten enthalten eine Metalloproteinase, die selektiv Kollagenfasern der Typen I und III abbaut, bei denen es sich um die Hauptkollagene der Zervix handelt (Hibbs et al.,

1982). Eine massive Infiltration des zervikalen Bindegewebes durch eosinophile Granulozyten im peripartalen Zeitraum, mit einem zeitgleichen Anstieg der Kollagenolyse, konnte sowohl beim Nager als auch beim Rind belegt werden (Luque et al., 1996; Wehrend, 2003).

Auch während des Zyklus laufen Umbauprozesse im Zervikalgewebe von Stuten ab, die denen im Partus in gewisser Weise ähneln, jedoch nicht dessen Ausmass erreichen. Die Zervix wird im Östrus zunehmend grösser und ödematisierter (Lieux, 1970; LeBlanc, 1992). Sie öffnet sich soweit, dass sie für drei oder mehr Finger passierbar wird. Manchmal lässt sich sogar die ganze Hand einführen (Greenhoff und Kenney, 1975). Sonographische echostrukturanalytische Untersuchungen an der equinen Zervix ergaben signifikante Korrelationen zwischen den Östradiolkonzentrationen im Blutplasma und den Grauwerten der Zervix (Meyer-Scheel, 2005).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie lässt sich vermuten, dass diese morphologischen Veränderungen an der equinen Zervix im Östrus durch die Infiltration eosinophiler Granulozyten bedingt sind, deren Migration wiederum durch den Östradiol/Progesteron-Quotienten beeinflusst wird.

5.5.3 Mastzellen in den Geschlechtsorganen

In den Geschlechtsorganen zeigten sich deutliche Differenzen in der Präsenz von Mastzellen. Ausschliesslich in der Zervix liessen sich in 94,7 % der Fälle Mastzellen nachweisen. In der Vagina gelang dies nur in 47,4 % der Fälle und im Uterus in 42,1 %. So liessen sich auch hier die Resultate vorhergehender Arbeiten bestätigen, dass Mastzellen zur physiologischen Zellpopulation der equinen Zervix gehören (Huchzermeyer et al., 2003; Wehrend et al., 2005).

Die Verteilung der Mastzellen auf die fünf Regionen der Zervix war analog zu der Verteilung der eosinophilen Granulozyten. In der uterusnahen Region 1 der Zervix fanden sich mit $0,91 \pm 1,63$ Zellen/mm² die höchsten Zelldichten, die nach caudal tendenziell abnahmen ($R_5 = 0,76 \pm 1,82$). Die regionalen Differenzen sind jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den eosinophilen Granulozyten.

Im Vergleich zu den eosinophilen Granulozyten lagen die Mastzellen in den tieferen Schichten der *Lamina propria mucosae*. Derartige Verteilungsunterschiede sind bereits in der Literatur beschrieben. Im bovinen Ovar konnten Mastzellen vor allem im Stroma nachgewiesen werden, während sich eosinophile Granulozyten vor allem periovulatorisch in der Granulosazellschicht und der *Theca interna* fanden (Reibiger und Spaniel-Borowski, 2000). Auch im humanen Endometrium zeigten sich unterschiedliche Bereiche von diesen beiden Zellpopulationen infiltriert (Jeziorska et al., 1995).

Die östrischen Tiere wiesen mit $14,02 \pm 17,63$ Zellen/mm² die mit Abstand höchste Mastzellichte auf. Dieser Zellgehalt war im Vergleich zur anöstrischen Gruppe dreifach und im Vergleich zur diöstrischen Gruppe 20-fach erhöht. Bei den anöstrischen Tieren fand sich eine 7-fach höhere Dichte als bei den diöstrischen Tieren. Dies steht im Gegensatz zum Vorkommen eosinophiler Granulozyten, wo bei den anöstrischen Tieren die geringsten Dichten festgestellt wurden. Bei den östrischen Tieren fanden sich sowohl Mastzellen als auch eosinophile Granulozyten in grossen Mengen. Statistisch signifikante Unterschiede der Mastzellzahlen lagen zwischen den diöstrischen und den östrischen Tieren in den Regionen 1 und 3 der Zervix vor ($p = 0,04$). Es bleibt zu beachten, dass die Gruppe der östrischen Tiere nur durch zwei Stuten repräsentiert wurde. Die vorliegenden Ergebnisse sind aufgrund dessen kritisch zu betrachten.

Die niedrigsten Gehalte an Mastzellen wiesen die diöstrischen Tiere auf. So lagen im Vergleich zu den Ergebnissen von Wrobel (1971) beim Rind, differente Zusammenhänge bei der Stute vor. Wrobel (1971) konnte maximale Werte an Mastzellen in der Zervix des Rindes im Diöstrus ausmachen. Allerdings vermutet der Autor eine fehlende Anfärbbarkeit der Mastzellen im Östrus durch eine Entspeicherung der Granula. Dieses Problem liess sich in der eigenen Untersuchung bei den Stuten nicht feststellen, gerade im Östrus fanden sich hohe Dichten an Mastzellen. Eventuell lassen sich jedoch die im Vergleich zum Anöstrus deutlich reduzierten Dichten im Diöstrus durch eine Entspeicherung der Granula erklären.

Ein mit der Stute vergleichbarer zyklischer Einfluss auf die Mastzellichte, allerdings im Uterus, konnte beim Schwein ausgemacht werden. Bei dieser Tierart nimmt die Mastzellichte des Uterus im Östrus ebenfalls maximale Werte an (Kaeoket et al., 2002). Bei Nagetieren liess sich ein Zusammenhang zwischen dem Zyklusstadium

und der Mastzellendichte in den Ovarien feststellen. Im Proöstrus kommt es zu einer Degranulation ovarieller Mastzellen. Die Degranulation der Mastzellen ist hierbei mit einer erhöhten Vaskularisation des Gewebes verbunden (Jones et al., 1980; Krishna und Terranova, 1985).

Diese statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den diöstrischen und den östrischen Tieren bezüglich der Infiltration mit Mastzellen lassen sich, wie schon bei den eosinophilen Granulozyten, durch die Abhängigkeit von den Hormonkonzentrationen erklären.

Ein statistisch signifikanter Einfluss auf die Mastzellendichte bestand in Region 1 ($p = 0,05$) und 5 ($p = 0,03$) der Zervix durch die Östradiol-17 β -Konzentration. Im Vergleich zu den eosinophilen Granulozyten, bei denen der statistisch signifikante Einfluss durch den Östradiol/Progesteron-Quotienten bedingt war, ist der hormonelle Einfluss auf die Mastzellendichte einzig in der Konzentration an Östradiol-17 β zu sehen.

Dieser positiv korrelierende Zusammenhang zwischen Östrogenen und Mastzellen ist in der Literatur bei einer Vielzahl an Spezies und Organen bewiesen worden (Ferrando und Nalbandov, 1986; Cocchiara et al., 1992; Gunin und Sharov, 1998). Mastzellen sind erwiesenermassen an der Umsetzung der Östrogenwirkung am Rattenuterus beteiligt. Durch die Applikation von Östradiol an ovariectomierte Ratten konnte ein Einfluss der Mastzellen auf Zellwachstum und Proliferation des Uterus festgestellt werden, welcher durch Histamin und Heparin vermittelt wurde (Gunin und Sharov, 1998). Während der embryonalen Implantation konnte bei der Ratte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Östrogenkonzentration und der Histaminproduktion durch Mastzellen festgestellt werden (Ferrando und Nalbandov, 1986). *In vitro* bedingt Östradiol eine verstärkte Freisetzung von Histamin aus uterinen Mastzellen, ausserdem setzen Mastzellen im Proöstrus und in der Präimplantationsphase höhere Gehalte an Histamin frei als im Diöstrus (Cocchiara et al., 1992).

Nicht nur auf die Mastzellen der Geschlechtsorgane besitzen Östrogene einen Einfluss. Auch in anderen Organsystemen wie beispielsweise dem Gehirn und dem Respirationstrakt konnte ein Einfluss der Östrogene auf die Mastzellinfiltration und -degranulation beobachtet werden (Wilhelm et al., 2000; Zhao et al., 2001). An den Mastzellen des oberen Respirationstraktes konnten sowohl Östrogen- als auch

Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden (Zhao et al., 2001). Der kardioprotektive Effekt der Östrogene, der die Prädisposition für Herzerkrankungen bei Frauen senkt, wird ebenfalls über kardiale Mastzellen vermittelt (Chancey et al., 2005).

In einigen Untersuchungen konnten jedoch auch umgekehrte Einflüsse der Sexualsteroiden auf die Mastzellen detektiert werden. Im Vaginalgewebe des Fuchskusus liess sich beispielsweise eine negative Korrelation zwischen Östrogenkonzentration und Mastzellendichte feststellen (Mahoney et al., 2003). Beim Schwein lag im Uterus eine positive Korrelation zwischen der Progesteronkonzentration und der Mastzellendichte vor (Kaeoket et al., 2002). Dies verdeutlicht, dass sich die Ergebnisse dieser Untersuchungen nicht auf andere Tierarten oder Geschlechtsorgane übertragen lassen. Dass ein prinzipieller Einfluss der Sexualsteroiden auf die Mastzellen besteht, ist inzwischen unbestritten. Allerdings muss dieser Einfluss für jede Tierart und jedes Organ neu ermittelt werden. Die statistisch signifikante Korrelation zwischen den Mastzellen im Uterus und den eosinophilen Granulozyten in der Vagina ($r = 0,62$; $p = 0,005$) verdeutlicht ebenfalls, dass die verschiedenen Geschlechtsorgane different zu betrachten sind. Unter dem gleichen hormonellen Einfluss weist die Vagina eine Infiltration mit eosinophilen Granulozyten und der Uterus eine Mastzellinfiltration auf.

Die Aufgaben der Mastzellen in der Zervix sind bisher ungeklärt. Zu vermuten ist eine Beteiligung an den strukturellen Veränderungen während des Zyklus.

Bosquiazzi et al. (2005) stellten in ihren Untersuchungen an der Ratte fest, dass es sich bei der Erweichung der Zervix um eine entzündliche Reaktion handelt, bei der immunkompetente Zellen, insbesondere die Degranulation von Mastzellen, eine wichtige Rolle spielen. Diese Ergebnisse aus Versuchen an der graviden Zervix belegen, dass Mastzellen im Rahmen struktureller Veränderungen an der Zervix von Bedeutung sind.

Mastzellen produzieren eine Reihe von Zytokinen, mit denen sie physiologische, immunologische und pathologische Prozesse beeinflussen können. Tryptase ist das aus den Mastzellgranula am meisten freigesetzte Protein, das selbst in sehr geringen Konzentrationen einen potenten Stimulus für die Akkumulation eosinophiler Granulozyten darstellen kann (He et al., 1997). Weitere Zytokine sind der *eosinophil*

chemotactic factor of anaphylaxis und Arachidonsäuremetaboliten, die ebenfalls zu einer Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten in das betroffene Gewebe führen (Jain, 1993 b; He et al., 1997).

Es liesse sich vermuten, dass die Mastzellakkumulation im zervikalen Gewebe zu einem gleichzeitigen Influx von eosinophilen Granulozyten führt. Dies konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht statistisch bestätigt werden. Zwischen den Gehalten an eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in allen drei Geschlechtsorganen lagen keine statistisch signifikanten Korrelationen vor (Vagina $r = 0,28$, $p = 0,24$; Zervix $r = 0,28$, $p = 0,30$; Uterus $r = 0,04$, $p = 0,88$). Die Mastzellen fanden sich im Vergleich zu den eosinophilen Granulozyten in tieferen Schichten der *Lamina propria mucosae*. Terada und Mitarbeiter (1985) untersuchten die Rolle der Mastzellen bei der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten im Uterus an kastrierten genetisch Mastzell-defizienten Mäusen. Durch die Injektion von Östradiol-17 β konnte sowohl bei den Mastzell-defizienten Tieren als auch bei den Kontrolltieren ein deutlicher Anstieg der Dichte eosinophiler Granulozyten induziert werden. Diese Arbeit verdeutlicht, dass Mastzellen für die östrogeninduzierte uterine Eosinophilie bei der Maus nicht notwendig sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten daraufhin, dass dies in den Geschlechtsorganen der Stute ebenso der Fall ist, zumindest liess sich keine räumliche Assoziation von erhöhten Dichten an Mastzellen und eosinophilen Granulozyten nachweisen.

Zusätzlich zur Zellrekrutierung führen Mastzellen über Substanzen wie Histamin, *slow-reacting substance of anaphylaxis* und Serotonin zu einer verstärkten Durchblutung und Permeation von Flüssigkeit in das entsprechende Gewebe. So wird eine erhöhte Reaktionsbereitschaft des Gewebes auf infektiöse Agenzien erreicht (Jain, 1993 b; Bradding et al., 1995). Diese Erhöhung der Gefässpermeabilität und Ödembildung führt zu Veränderungen der Gewebetextur (Jeziorska et al., 1995). Über intrazelluläre Enzyme und die Stimulation der Fibroblasten wird verstärkt Bindegewebsmatrix synthetisiert (Cairns und Walls, 1997). Durch die Freisetzung von Histamin und weiteren Mediatoren kommt es über Histamin-1-Rezeptoren zu einer erhöhten zervikalen Kontraktilität (Bytautiene et al., 2002).

Im humanen Endometrium konnte vor und während der Menstruation ein dramatischer Anstieg der Mastzellkonzentration festgestellt werden (Jeziorska et al., 1995). Die Mastzelldegranulation bedingt eine Hochregulation und Aktivierung von

Metalloproteinasen (Zhang et al., 1998). Die zinkabhängigen, proteolytischen Matrixmetalloproteinasen spielen eine dominierende Rolle in der Umgestaltung des Bindegewebes (Kloss, 2004). In adultem Gewebe findet eine geringe Expression dieser Enzyme statt, die bei Bedarf über verschiedenste Signale jedoch eine rasante Steigerung erfahren können (Bosman und Stamenkovic, 2003). Die durch Mastzellen induzierte Hochregulation der Metalloproteinasen bedingt beim Menschen den Abbau der Basallamina und der Endometriumsdrüsen, was zur Blutung während der Menstruation führt (Wilhelm et al., 2000).

Eine erhöhte Dichte an Mastzellen in der Zervix konnte an Ratten *intra partum* festgestellt werden. Dies war auch nach Behandlung von graviden Tieren mit Antigestagenen der Fall. Durch die Applikation von Antigestagenen fand eine Degranulation der Mastzellen statt. Bei gleichzeitiger Verabreichung eines Mastzellstabilisators konnte die Degranulation verhindert werden und die Erweichung der Zervix wurde vermindert. Dieser Effekt der Mastzelldegranulation auf die Umbauvorgänge der Zervix soll durch Tryptase vermittelt sein (Spanggaard et al., 1997). Für die Aktivierung der latenten Prokollagenase ist die Aktivierung von Prostromelysin nötig. Tryptase, die aus Mastzellen freigesetzt wird, ist fähig Prostromelysin und somit Prokollagenase zu aktivieren (Gruber et al., 1989). So lässt sich der molekularbiologische Weg über die Mastzelldegranulation zum Kollagenabbau und damit zur Erweichung des zervikalen Bindegewebes nachvollziehen.

Der makroskopische und histologische Aufbau der Zervix der Stute unterliegt starken zyklischen Veränderungen. Gerade im Östrus kommt es zu einer Ödematisierung und Erweichung des Gewebes. Der *Canalis cervicalis* öffnet sich. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung lassen vermuten, dass die Mastzellen, wie auch die eosinophilen Granulozyten, an den zyklischen Umbauprozessen der equinen Zervix beteiligt sind.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Zervix bei Maidenstuten im Vergleich zu pluriparen Tieren zu einem geringeren Grad relaxiert (Greenhoff und Kenney, 1975; LeBlanc et al., 2003). Dies führt dazu, dass diese Stuten unabhängig von ihrem Alter gehäuft Endometritiden nach der Bedeckung entwickeln (Malschitzky et al., 2006). Durch die ungenügende Relaxierung der Zervix während des Östrus kommt es zu einer verminderten uterinen Drainage und damit zur Akkumulation von Flüssigkeit im

Uteruslumen. Die Applikation von Prostaglandin E₁ an diese Stuten zur Relaxation der Zervix und Drainage des Uterus ist in der Literatur erfolgreich beschrieben (Nie und Barnes, 2003).

Gehäuft finden sich diese Zusammenhänge bei Maidenstuten, die schon über zehn Jahre alt sind. Bei diesen Tieren erscheint die Zervix besonders eng verschlossen (Pycock, 1993; LeBlanc, 2003). Bei sehr nervösen Jungstuten ergeben sich ähnliche Probleme. Bisher ist die Ursache dieser zervikalen Funktionsstörung bei Maidenstuten nicht geklärt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten jedoch einen neuen Ansatzpunkt liefern, um dem pathophysiologischen Hintergrund dieses Problems nachzugehen. In dieser Studie war vorberichtlich nicht zu klären, ob es sich bei den Probanden um Maidenstuten handelte. Weitere Untersuchungen sollten sich anschliessen, um eventuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Altersgruppen sowie zwischen primi- und pluriparen Tieren zu detektieren.

5.6 Schlussbetrachtung

Die Zervikalzytologie hat sich als einfaches Verfahren zur Diagnostik subklinischer entzündlicher Veränderungen der Zervix erwiesen. Weitere Studien sollten sich anschliessen, um spezielle Richtwerte für die Beurteilung der Zervikalzytologie zu ermitteln. Die Bedeutung der Zervizitis bei sub- und infertilen Zuchtstuten bleibt ebenfalls zu klären.

Bei den histologischen Untersuchungen handelt es sich um eine rein deskriptive Darstellung der hormon- und zyklusabhängigen Veränderungen an der equinen Zervix. Es konnten zyklus- und hormonabhängige Modifikationen der Infiltration der Zervix mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen festgestellt werden. Aufgrund der kleinen Gruppe östrischer Tiere in der vorliegenden Studie ($n = 2$) sollten diese Untersuchungen an einem grösseren Kollektiv wiederholt werden. Um die Gruppe der östrischen Tiere auszubauen wäre über eine hormonelle Östrusinduktion nachzudenken.

Um die vorliegenden Erkenntnisse zu bestätigen, sollten sich Studien an ovariectomierten Stuten anschliessen, die gezielt mit Hormonen behandelt werden. Auch die pathophysiologischen Zusammenhänge, die zu den beschriebenen Veränderungen führen, konnten durch das Studiendesign nicht beantwortet werden. Molekularbiologische Studien könnten über die Mechanismen die zur Rekrutierung der beschriebenen Zellpopulationen führen sowie deren Funktion im equinen Zervikalgewebe Aufschluss geben.

Desweiteren stellt sich die Frage, ob sich ein Unterschied bei differenzierter Betrachtung von Tieren mit unterschiedlicher Geburtenzahl ergeben würde, um so eventuell den pathophysiologischen Zusammenhang der gehäuften Zervixfunktionsstörungen bei Maidenstuten zu klären.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Methode der exfoliativen Zervikalzytologie bei Zuchtstuten zu etablieren und die Dichte eosinophiler Granulozyten und Mastzellen als Bestandteil des lokalen Abwehrsystems in Vagina, Zervix und Uterus und ihre potenzielle Beeinflussung durch die Zyklusphasen und die peripheren Hormonkonzentrationen zu untersuchen.

Es wurden die Genitaltrakte von 26 Stuten direkt nach der Schlachtung gewonnen und nach Entnahme einer exfoliativen Zervikal- und Endometriumszytologie Gewebe aus Vagina, Zervix und Uterus histologisch untersucht. Die Anfärbung der Zytologien erfolgte mittels Papanicolaou-Shorr-Färbung. Zur histologischen Untersuchung wurden die Färbungen Hämatoxylin-Eosin, Sirius-Red und Toluidin-Blau durchgeführt. Weiterhin wurden bei jeder Stute die Plasmakonzentrationen von Östradiol-17 β und Progesteron bestimmt.

Folgende relevanten Ergebnisse konnten erzielt werden:

Zyklusdiagnostik:

- Es zeigte sich, dass die makroskopische Beurteilung der Geschlechtsorgane nicht dazu geeignet ist, eine Aussage zur hormonellen Situation bei der Stute zu treffen.

Zytologie:

- Mit Hilfe der Färbung nach Papanicolaou-Shorr liessen sich Epithelzellen der Zervix und des Uterus deutlich voneinander differenzieren.
- Zervikalzellen exfoliierten weniger als Endometriumszellen.
- Zwischen der Gesamtzellzahl von Endometriums- und Zervikalzytologien bestand eine signifikante positive Korrelation ($r = 0,5$; $p = 0,009$).

- Ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis neutrophiler Granulozyten in Endometriums- und Zervikalzytologien war nicht nachweisbar ($r = 0,36$; $p = 0,07$).
- Die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Zervikalzytologie nahm bei steigender Progesteronkonzentration ab ($r = -0,47$; $p = 0,03$).

Histologie:

- Die östrischen Stuten wiesen in der gesamten Zervix im Vergleich zu den anöstrischen ($p = 0,04$) und diöstrischen ($p = 0,04$) Tieren signifikant höhere Dichten an eosinophilen Granulozyten auf.
- Die Dichte eosinophiler Granulozyten wurde in der Region 2 des Zervikalgewebes vom Östradiol/Progesteron-Quotienten signifikant beeinflusst ($r = 0,52$; $p = 0,02$). Bei steigendem Östradiol/Progesteron-Quotienten nahm die Dichte eosinophiler Granulozyten zu.
- Zwischen der Dichte eosinophiler Granulozyten in den Organen Vagina, Zervix und Uterus bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang.
- Die östrischen Tiere wiesen in den Regionen 1 ($p = 0,04$) und 3 ($p = 0,04$) der Zervix im Vergleich zu den diöstrischen Tieren statistisch signifikant höhere Mastzellichten auf. In der Gesamtzervix war dieser Einfluss nicht statistisch signifikant.
- Im zervikalen Gewebe stieg die Mastzellichte im cranialsten ($r = 0,46$; $p = 0,05$) und caudalsten Abschnitt ($r = 0,5$; $p = 0,03$) des *Canalis cervicalis* mit steigenden Östradiol- 17β -Konzentrationen signifikant an.
- Zwischen der Mastzell-Dichte in den Organen Vagina, Zervix und Uterus bestand kein signifikanter Zusammenhang.

- Die Mastzelldichte im Uterus wies eine signifikant positive Korrelation zur Dichte eosinophiler Granulozyten in der Vagina auf ($r = 0,62$; $p = 0,005$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die exfoliative Zervikalzytologie ein geeignetes Verfahren darstellt, um eine Zervizitis bei der Stute zu diagnostizieren. Der vom Progesteron bekannte immunsuppressive Effekt wirkt sich auch auf das Zervikalgewebe aus.

Im histologischen Teil der Arbeit wird deutlich, dass die Dichten eosinophiler Granulozyten und Mastzellen im zervikalen Gewebe durch die peripheren Hormonkonzentrationen beeinflusst werden. Dabei liess sich bei erhöhten Östradiol- 17β -Konzentrationen und Östradiol/Progesteron-Quotienten ein Anstieg der Zelldichten nachweisen. Derartige Zusammenhänge liessen sich nicht in Vagina und Uterus aufzeigen. Diese Ergebnisse unterstützen die Auffassung, dass Östrogene die Gewebsinfiltration der Zervix mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen steuern beziehungsweise fördern.

Weitergehende Untersuchungen müssen sich mit der physiologischen Bedeutung der vorgestellten Ergebnisse beschäftigen, um zu klären, welche Rolle diese beiden Zellpopulationen im Rahmen der zyklischen Umbauprozesse der equinen Zervix spielen.

7 Summary

One aim of the present study was to establish the exfoliative cervical cytology in the gynaecological examination of brood mares. A further aim was to examine the frequency of eosinophil granulocytes and mast cells as a part of the local immune system of vagina, cervix and uterus and its potential influence by the estrous cycle and the peripheral hormone concentrations on these cell populations.

The genital tracts of 26 mares were extracted directly after slaughtering and exfoliative smears of cervix and endometrium were taken. Tissue samples of vagina, cervix and uterus were examined histologically. Staining of the cytologies was carried out via the Papanicolaou-Shorr-Method. For the histological analysis the Hematoxylin-Eosin, Sirius-Red and Toluidin-blue stainings were performed. For each mare the plasma concentration of estradiol-17 β and progesterone was determined.

The following relevant results were obtained:

Oestrous cycle:

- The macroscopic assessment of the genital tract is not sufficient to ascertain the endocrine status of a mare

Cytology:

- By means of the staining according to Papanicolaou-Shorr epithelial cells of cervix and uterus could be clearly distinguished.
- Cells of cervical origin exfoliate less than endometrial cells.
- A significant positive correlation ($r = 0.5$; $p = 0.009$) existed between the total number of cells in cervical and endometrial cytologies.
- A correlation between the detection of neutrophils in endometrial and cervical cytologies could not be demonstrated ($r = 0.36$; $p = 0.07$).

- The number of neutrophil granulocytes in the cervical cytology decreased with rising progesterone concentrations ($r = -0.47$; $p = 0.03$).

Histology:

- The mares in oestrus showed significant higher frequencies of eosinophil granulocytes in the whole cervix in comparison to mares expressing anoestrus ($p = 0.04$) and dioestrus ($p = 0.04$).
- The density of eosinophils in region 2 of cervical tissue was influenced significantly ($r = 0.52$; $p = 0.02$) by the estradiol/progesterone-ratio. The density of eosinophil granulocytes increased with higher values of the estradiol/progesterone-ratio.
- No significant relationship between the frequency of eosinophil granulocytes in vagina, cervix and uterus could be observed.
- Mares displaying oestrus showed statistically significant higher frequencies of mast cells in regions 1 ($p = 0.04$) and 3 ($p = 0.04$) of the cervix compared with the animals in dioestrus. For the total of the cervix this influence was not statistically significant.
- With increasing estradiol- 17β concentrations the frequency of mast cells increased statistically significant in the cervical tissue of the cranial ($r = 0.46$; $p = 0.05$) and caudal region ($r = 0.5$; $p = 0.03$) of the *canalis cervicalis*.
- No significant relationship between the frequency of mast cells in vagina, cervix and uterus could be observed.
- The frequency of mast cells in the uterus showed a significant positive correlation ($r = 0.62$; $p = 0.005$) to the frequency of eosinophils in the vagina.

These results show, that the exfoliative cervical cytology is an appropriate method to detect cervicitis in mares. The known immunosuppressive effect of progesterone is reflected in the cervical tissue.

The histological part of this study points out, that the densities of eosinophil granulocytes and mast cells in cervical tissue are influenced by the peripheral hormone concentrations. Elevated estradiol-17 β concentrations and estradiol/progesterone-ratios caused advanced cell densities in cervical tissue. Such correlations could not be detected in vagina or uterus. These results support the concept, that estrogens regulate or enhance the infiltration of cervical tissue by eosinophils and mast cells.

Further investigations have to deal with the physiological relevance of the presented results, to elucidate which role these two cell populations play in the range of the cyclic remodelling of the equine cervix.

8 Anhang

8.1 Geräte

- Cell-Dyn 3500, Abbott, Wiesbaden-Delkenheim
- Zentrifuge Rotixa/KS, Hettich, Tuttlingen
- Digitalkamera Mavica, MVC-FD95, Sony, Köln
- Einbettautomat, Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg
- Wasserdestillation, Millipor-Anlage, Milli Q Biocel, Millipore, Billerica, USA
- Mikrotom, Medim, Gießen
- Wasserbad Typ WB-24, V 220, W 550, MEDAX Nagel KG, Kiel
- Wärmeschrank Typ ST 40, V 220, Hz 50, W 2000, Memmert, Schwabach
- Mikroskop DMR, Leica, Wetzlar
- Digitalkamera DC 300, Leica, Wetzlar
- PC GX 240, Dell, Frankfurt am Main
- Bildanalyseprogramm Leica Image Manager, Leica, Wetzlar

8.2 Materialien

- Histologiekäfige Tissue-Tek®, Mega-Cassette®, Sakwa Finetek, USA
- Objektträger 76 x 26 mm, Firma iDL, Nidderau
- Einmalklinge, Disposable Microtome Blade, Model 81950 PCS, Leica, Wetzlar
- Roti®-Histokitt, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Deckgläser 24 x 50 mm, Menzel Gläser, Braunschweig
- EDTA-Blut Röhrchen, Sarstedt, Nümbrecht
- Lithium-Heparin-Blut Röhrchen, Sarstedt, Nümbrecht

8.3 Lösungen

- Neutral gepuffertes Formol nach Lillie:

Formol 40 %, Merck, Darmstadt	500,0 ml
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O, Merck, Darmstadt	20,0 g
Na ₂ HPO ₄ , Merck, Darmstadt	32,5 g
<i>Aqua destillata</i>	=> ad 5000,0 ml

- Natriumphosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,2):
 - Lösung 1 (0,1 m):

NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O, Merck, Darmstadt	13,8 g
<i>Aqua destillata</i>	=> ad 1000,0 ml
 - Lösung 2 (0,1m):

Na ₂ HPO ₄ , Merck, Darmstadt	17,8 g
<i>Aqua destillata</i>	=> ad 1000,0 ml
 - Gebrauchslösung:

Lösung 1:	28,3 ml
Lösung 2:	71,7 ml
- Alkohol absolut, Schmidt, Dillenburg
- Rotihistol, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- 3-Aminopropyltriethoxy-Silan 2 % (APES):

APES, Merck, Darmstadt	10,0 ml
Aceton reinst, Merck, Darmstadt	490,0 ml
- Shorr'sche Farblösung, Merck, Darmstadt
- Papanicolaous Lösung 1b)

Hämatoxylinlösung S, Merck, Darmstadt
- Hämatoxylin nach Meyer:

Hämatoxylin, Merck, Darmstadt	1 g
<i>Aqua destillata</i>	1000 g
=> unter Schütteln auflösen	
NaSO ₃ , Merck, Darmstadt	0,2 g
Kalialaun, Merck, Darmstadt	50,0 g
Chloralhydrat, Merck, Darmstadt	50,0 g
Zitronensäure, Merck, Darmstadt	1,0 g
=> einrühren, 2 - 3 Tage stehen lassen und dann filtrieren	

- Eosin:
Eosin G, Merck, Darmstadt 1 g
Aqua destillata 100 ml
Eisessig, Merck, Darmstadt 1 Tropfen
=> auflösen

- Sirius-Red-Lösung
Sirius-Red F3B, Dystar, Leverkusen 500,0 mg
Aqua destillata 45,0 ml
Ethanol absolut, Schmidt, Dillenburg 50,0 ml
NaOH 1 %, Merck, Darmstadt 1,0 ml
=> auflösen
NaCl-Lösung 0,9 % ca. 4,0 ml
=> zugeben bis es zur leichten Präzipitation kommt
Lagerung über 24 Stunden, danach Filtration

- Toluidin-Blau O-Färbelösung 0,1 %:
Toluidin O, Chroma-Gesellschaft, Köngen 0,2 g
Puffer nach Soerensen 200 ml
=> auflösen

- Puffer nach Soerensen:
 - Lösung 1:
KH₂PO₄, Merck, Darmstadt 9,08 g
Aqua destillata => ad 1000 ml
 - Lösung 2:
Na₂HPO₄, Merck, Darmstadt 2,97 g
Aqua destillata => ad 250 ml
 - Gebrauchslösung:
Lösung 1: 1,2 ml
Lösung 2: => ad 200 ml

9 Literaturverzeichnis

Aerts, J. L. E., Christiaens, M.-R., Vandekerckhove, P. (2002)

Evaluation of progesterone receptor expression in eosinophils using real-time quantitative PCR

Biochimica et Biophysica Acta, 1571 (3), 167-172

Aiyer, M. S., Chiappa, S. A., Fink, G. (1974)

A priming effect of luteinizing hormone-releasing factor on the anterior pituitary gland in the female rat

J. Endocrinol., 62, 573-588

Alexander, S. L., Irvine, C. H. G. (1992)

5. FSH and LH

In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 45-57

Andrews, F. N., McKenzie, F. F. (1941)

Estrus, ovulation and related phenomena in the mare

Univ. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull, 329, 1-117

Asbury, A. C. (1984)

Endometritis diagnosis in the mare

Equine Vet. Data, 58, 166

Aurich, C., Klug, E. (1993)

Endokrinologie des Sexualzyklus beim Pferd

Prakt. Tierarzt, 10, 889-895

Bader, H., Genn, H. J., Klug, E., Martin, J. C., Himmler, V. (1978)

Vaginalzytologische Untersuchungen beim Pferd

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 85, 226-231

Bain, A. M. (1966)

The role of infection in infertility in the thoroughbred mare

Vet. Rec., 78, 168-171

Ball, B. A., Shin, S. J., Patten, V. H., Lein, D. H., Woods, G. L. (1988)

Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium

Theriogenology, 29 (6), 1269-1283

Barrier-Battut, I., Le Poutre, N., Trocherie, E., Hecht, S., Grandchamp des Raux, J. L., Nicaise, J. L., Vérin, X., Bertrand, J., Fiéni, F., Hoier, R., Renault, A., Egron, L., Tainturier, D., Bruyas, J. F. (2001)

Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare

Theriogenology, 55, 1679-1695

Bassett, E. G. (1962)

Infiltration of eosinophils into the modified connective tissue of oestrous and pregnant animals

Nature, Lond., 194, 1259-1261

Basu, J., Mikhail, M. S., Palan, P. R., Payraudeau, P. H., Romney, S. L. (1992)

Factors influencing the exfoliation of cervicovaginal epithelial cells

Am. J. Obstet. Gynecol., 167 (6), 1904-1909

Benarafa, C., Cunningham, F. M., Hamblin, A. S., Horohov, D. W., Collins, M. E. (2000)

Cloning of equine chemokines eotaxin, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, MCP-2 and MCP-4, mRNA expression in tissues and induction by IL-4 in dermal fibroblasts

Vet. Immunol. Immunopathol., 76 (3-4), 283-298

Bergfelt, D. R., Mann, G. B., Schwartz, B. N., Ginther, O. J. (1991)

Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the oestrous cycle of mares

Equine Vet. Sci., 11, 319-322

Bienkiewicz, A. (1995)

The influence of prostaglandins, cyclooxygenase and lipoxxygenase inhibitors on collagen concentration in the rat uterine cervix

Horm. Metab. Res., 27, 79-82

Blanchard, T. L. (1982)

Congenitally incompetent cervix in a mare

J. Am. Vet. Med. Assoc., 181, 266

Bosman, F. T., Stamenkovic, I. (2003)

Functional structure and composition of the extracellular matrix

J. Pathol., 200, 423-428

Bosquiazso, V. L., Durando, M., Varayoud, J., Ramos, J. G., Rodriguez, H. A., Munoz-de-Toro, M., Luque, E. H. (2005)

Macrophage density in the pregnant rat uterine cervix is modulated by mast cell degranulation

J. Reprod. Immunol., 65 (2), 147-158

Bostedt, H., Lehmann, B. (1994)

Überprüfung der Ovaraktivität bei Stuten mittels Progesteronverlaufsprofilen

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 101 (2), 43-46

Bourke, M., Mills, J. N., Barnes, A. L. (1997)

Collection of endometrial cells in the mare

Aust. Vet. J., 75 (10), 755-758

Bradding, P., Walls, A. F., Church, M. K. (1995)

Mast cells and basophils: their role in initiating and maintaining inflammatory responses

In: Holgate, S. T. (Hrsg.): Immunopharmacology of the respiratory system, Academic Press, New York, 53

Brandt, G. W. (1970)

The significance and interpretation of uterine biopsy in the mare

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 279-283

Britton, B. A. (1982)

Endometrial change in the annual reproductive cycle of the mare

J. Reprod. Fert. Suppl., 32, 175-180

Brodauf, H. (1952)

Zervixanomalien als Indikation für die technische Besamung bei Stuten

Mh. Vet. Med., 7 (16), 309-312

Brook, D. (1983)

Exfoliative endometrial cytology in the mare

Diss. med. vet., Stellenbosch, South Africa

Brook, D. (1985)

Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium

Equine Vet. Sci., 5 (1), 16-22

Brook, D. (1992)

28. Uterine Cytology

In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 246-254

Brown-Douglas, C. G., Firth, E. C., Parkinson, T. J., Fennessy, P. F. (2004)

Onset of puberty in pasture-raised Thoroughbreds born in southern hemisphere spring and autumn

Equine Vet. J., 36 (6), 499-504

Bruner, D. W. (1951)

Notes on genital infection in the mare

Cornell. Vet., 41, 247-250

Bryman, I., Norström, A., Lindblom, B. (1985)

Has cervical smooth muscle any physiological role in the human?

Acta Physiol. Hung., 65, 327-330

Burger, L. L., Sherwood, O. D. (1995)

Evidence that cellular proliferation contributes to relaxin-induced growth of both the vagina and the cervix in the pregnant rat

Endocrinology, 136, 4820-4826

Burger, L. L., Sherwood, O. D. (1998)

Relaxin increases the accumulation of new epithelial and stromal cells in the rat cervix during second half of pregnancy

Endocrinology, 139 (9), 3984-3995

Bytautiene, E., Vedernikov, Y. P., Saade, G. R., Romero, R., Garfield, R. E. (2002)

Endogenous mast cell degranulation modulates cervical contractility in the guinea pig

Am. J. Obstet. Gynecol., 186 (3), 438-445

Cairns, J. A., Walls, A. F. (1997)

Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts

J. Clin. Invest., 99, 1313-1321

Card, C. (2005)

Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares

Theriogenology, 64, 580-588

Cary, W. H. (1943)

A method of obtaining endometrial smears for study of their cellular content

Am. J. Obst. and Gynec., 46, 422

Chancey, A. L., Gardner, J. D., Murray, D. B., Brower, G. L., Janicki, J. S. (2005)

Modulation of cardiac mast cell-mediated extracellular matrix degradation by estrogen

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 289, 316-321

Cicinelli, E., Stanziano, A., Parisi, C., Marinaccio, M., Causio, F. (2005)

Hysteroscopic diagnosis and treatment of endocervical ossification: a case report

J. Minim. Invasive Gynecol., 12 (2), 159-161

Cocchiara, R., Albeggiani, G., Di Trapani, G., Azzolina, A., Lampiasi, N., Rizzo, F., Diotallevi, L., Gianaroli, L., Greraci, D. (1992)

Oestradiol enhances in vitro the histamine release induced by embryonic histamine-releasing factor (EHRF) from uterine mast cells

Hum. Reprod., 7 (8), 1036-1041

Collins, S. M. (1964)

A study of the cervical and uterine infection in thoroughbred mares in Ireland

Vet. Rec., 76, 673-677

Collobert-Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C., Chartier, C., Dorchies, P. (2002)

Mast cells and eosinophil mucosal response in the large intestine of horses naturally infected with cyathostomes

Vet. Parasitol., 107 (3), 251-264

Conboy, H. S. (1978)

Diagnosis and therapy of equine endometritis

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 165-171

Couto, M. A., Hughes, J. P. (1984)

Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare

Equine Vet. Sci., 4 (6), 265-273

Couto, M. A., Hughes, J. P. (1985)

Intrauterine inoculation of a bacteria-free filtrate of streptococcus zooepidemicus in clinically normal and infected mares
Equine Vet. Sci., 5 (2), 81-86

Crickmann, J. A., Pugh, D. G. (1986)

Equine endometrial cytology: A review of techniques and interpretations
Vet. Med., 650-656

**Daels, P. F., Ammon, D. C., Stabenfeldt, G. H., Liu, I. K. M., Hughes, J. P.,
Lasley, B. L. (1991)**

Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares
Theriogenology, 35 (5), 1001-1017

Daels, P. F., Hughes, J. P. (1992)

14. The normal estrous cycle
In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 121-133

Dascanio, J. J. (2003)

Endometrial Cytology
In: Robinson, N. E. (Hrsg.): Current therapy in equine medicine, 5. Auflage, Saunders, Philadelphia, 226-228

Davies Morel, M. C. G. (2003)

3. Endocrine control of reproduction in the mare
In: Davies Morel, M. C. G. (Hrsg.): Equine reproductive physiology, breeding, and stud management, 2. Auflage, CABI Publishing, Wallingford, 28-39

Day, W. E., Evans, J. W., Vogelsang, M. M., Westhusin, M. E. (1995)

Characterization of the cervix in cycling mares using ultrasound
Biol. Reprod. Mono., 1, 519-526

Diekman, M. A., Braun, W., Peter, D., Cook, D. (2002)

Seasonal serum concentrations of melatonin in cycling and noncycling mares

J. Anim. Sci., 80, 2949-2952

Dobson, H. (1988)

Softening and dilatation of the uterine cervix

Oxf. Rev. Reprod. Biol., 10, 491-514

Döcke, F. (1994)

16. Keimdrüsen

In: Döcke, F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, 399-498

Downing, K. J., Sherwood, O. D. (1986)

The physiological role of relaxin in the pregnant rat: 4. The influence of relaxin on cervical collagen and glycosaminoglycans

Endocrinology, 118 (2), 471-479

Ekman, G., Malström, A., Uldbjerg, N., Ulmstein, U. (1986)

Cervical collagen: An important regulator of cervical function in term labor

Obstet. Gynecol., 67, 633-636

El-Banna, A. A., Hafez, E. S. E. (1972)

The uterine cervix in mammals

Am. J. Obstet. Gynecol., 112 (1), 145-164

Ellwood, D. A., Anderson, A. B., Mitchell, M. D., Murphy, G., Turnbull, A. C. (1981)

5. Prostanoids, collagenase and cervical softening in the sheep

In: Ellwood, D. A., Anderson, A. B. (Hrsg.): The cervix in pregnancy and labour, Churchill Livingstone, Oxford, 57-73

Fateh El-Bab, M. R., El-Naggar, M. A. (1975)

A histological and histochemical study of the cervix uteri of the buffalo cow during estrus cycle

Zbl. Vet. Med., A (22), 164-175

Ferrando, G., Nalbandov, A. V. (1986)

Relative importance of histamine and estrogen on implantation in rats

Endocrinology, 83, 933-937

Ferreira, C. D. A. (1956)

Diagnosis of ovulation by endometrial cytology

Proc. 2nd World Cong. Fertil. and Steril., 1, 525

Fischer, G., Tradler, T., Zarnt, T. (1998)

The mode of action of peptidyl propyl cis/trans isomerases in vivo: binding vs. catalysis

FEBS Lett., 426, 17-20

Fitzpatrick, R. J., Liggins, G. C. (1980)

Effects of prostaglandins on the cervix of pregnant women and sheep

In: Naftolin, F., Stubblefield, P. G. (Hrsg.): Dilatation of the uterine cervix, Raven Press, New York, 287-300

Foster, R. A., Gartley, C. J., Newman, S. (1997)

Varices with thrombosis in the cervix and uterus of a mare

Can. Vet. J., 38, 375-376

Freeman, K.-P., Roszel, J.-F., Slusher, S. H. (1986)

Equine endometrial cytologic smear patterns

Compend. Contin. Educ. Practicing Vet., 8, 349-360

Gadd, J. D. (1975)

The relationship of bacterial cultures, microscopic smear examination and medical treatment to surgical correction of barren mares

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 362-368

Galeotti, M., Beluzzi, S., Volpatti, D., Bergonzoni, M. L., Agaro, E. D., Volpelli, L. A. (1997)

Evaluation of mast cells in calf and heifer uteri
Theriogenology, 48, 1301-1311

Ganjam, V. K., McLeod, C., Klesius, P. H., Washburn, S. M., Kwapien, R., Brown, B., Attleberger, M. (1980)

The effect of ovarian hormones on the pathophysiologic mechanisms involved in resistance versus susceptibility to uterine infections in the mare
Proceedings of the annual convention of the american association of equine practitioners, 141-153

Ganjam, V. K., McLeod, C., Klesius, P. H., Washburn, S. M., Kwapien, R., Brown, B., Fazeli, M. H. (1982)

Effects of ovarian hormones on the phagocytic response of ovariectomized mares
J. Reprod. Fert. Suppl., 32, 169-174

Gastal, E. L., Gastal, M. O., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. (1997)

Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares
Biol. Reprod., 57, 1320-1327

Giembycz, M. A., Lindsay, M. A. (1999)

Pharmacology of the eosinophil
Pharmacol. Rev., 51 (2), 213-339

Ginther, O. J. (1986)

12.3 Ultrasonic anatomy of the cervix

In: Ginther, O. J. (Hrsg.): Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare: basic and applied aspects, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, 177

Ginther, O. J. (1992 a)

Kap. 1: Reproductive anatomy

In: Ginther, O. J. (Hrsg.): Reproductive biology of the mare, basic and applied aspects, 2. Auflage, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, 1-40

Ginther, O. J. (1992 b)

Kap. 6: Characteristics of the ovulatory season

In: Ginther, O. J. (Hrsg.): Reproductive biology of the mare, basic and applied aspects, 2. Auflage, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, 173-232

Ginther, O. J. (1992 c)

Kap. 7: Endocrinology of the ovulatory season

In: Ginther, O. J. (Hrsg.): Reproductive biology of the mare, basic and applied aspects, 2. Auflage, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, 233-290

Ginther, O. J. (2000)

Selection of the dominant follicle in cattle and horses

Anim. Reprod. Sci., 60-61, 61-79

Ginther, O. J., Beg, M. A., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Baerwald, A. R., Pierson, R. A. (2005)

Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study

Reproduction, 130 (3), 379-388

Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Beg, M. A. (2005)

Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares

Biol. Reprod., 73 (2), 315-323

Gordon, A. J., Calder, A. A. (1977)

Oestradiol applied locally to ripen the unfavourable cervix

Lancet, Dec 24-31 (2), 1319-1321

Götze, R. (1949)

IV. Spezielles zur Samenübertragung bei den einzelnen Haustierarten; D. Pferd
In: Götze, R. (Hrsg.): Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere, Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 380-514

Gouon-Evans, V., Pollard, J. W. (2001)

Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus
Endocrinology, 142 (10), 4515-4521

Greenhoff, G. R., Kenney, R. M. (1975)

Evaluation of reproductive status of nonpregnant mares
J. Am. Vet. Med. Assoc., 167, 449-458

Gruber, B. L., Marchese, M. J., Suzuki, K., Schwartz, L. B., Okada, Y., Nagase, H., Ramamurthy, N. S. (1989)

Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation
J. Clin. Invest., 84, 1657-1662

Gunin, A. G., Sharov, A. A. (1998)

Role of mast cells in oestradiol effects on the uterus of ovariectomized rats
J. Reprod. Fert., 113, 61-68

Hammond, J., Wodzicki, K. (1940)

Anatomical and histological changes during the oestrous cycle in the mare
Proc. Roy. Soc. B, 130 (1), 85-86

Handler, J. (2005)

3. Gynäkologische Untersuchung (Zuchttauglichkeitsuntersuchung) bei der Stute
In: Aurich, C. (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd; Gynäkologie - Andrologie - Geburtshilfe, 1. Auflage, Parey-Verlag, Stuttgart, 31-50

Handler, J., Aurich, J. E. (2005)

2. Physiologie des Sexualzyklus der Stute

In: Aurich, C. (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd; Gynäkologie - Andrologie - Geburtshilfe, 1. Auflage, Parey-Verlag, Stuttgart, 15-29

Harris, E. D., Krane, S. M. (1974)

Collagenases

New Engl. J. Med., 291, 557-563

Hawk, H. W., Turner, G. D., Sykes, J. F. (1960)

The effect of ovarian hormones on the uterine defense mechanism during the early stages of induced infection

Am. J. Vet. Res., 21, 644-648

Hayes, K. E. N., Pierson, R. A., Scraba, S. T., Ginther, O. J. (1985)

Effects of oestrous and season on ultrasonic uterine anatomy in mares

Theriogenology, 24, 465-477

He, S., Peng, Q., Walls, F. (1997)

Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine

J. Immunol., 159, 6216-6225

Hecht, E. L. (1952)

The value of the endometrial smear in the detection of malignancy

New York J. Med., 52, 2745

Hein, K. (2000)

Morpho-funktionelle Untersuchungen an der Cervix uteri und am Endometrium der Stute im Verlauf des Zyklus

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

Hellich, W. (1940)

Untersuchungen über den Zyklus der Stute. VI. Beitrag: Scheidenabstriche

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

Hemberg, E., Lundeheim, N., Einarsson, S. (2005)

Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares

J. Vet. Med. A, 52, 474-477

Hibbs, M. S., Mainardi, C. L., Kang, A. H. (1982)

Type - specific collagen degradation by eosinophils

Biochem. J., 207, 621-624

Hillier, K., Wallis, R. M. (1981)

11. Prostaglandins, steroids and the human cervix

In: Ellwood, D. A., Anderson, A. B. (Hrsg.): The cervix in pregnancy and labour, Churchill Livingstone, Oxford, 144-162

Hinrichs, K., Kenney, R. M. (1987)

Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomized rats

J. Reprod. Fert., 35, 439-443

Hoffmann, B., Schams, D., Giménez, T., Ender, M. L., Herrmann, C., Karg, H. (1973)

Changes of progesterone, total oestrogens, corticosteroids, prolactin and LH in bovine peripheral plasma around parturition with special reference to the effect of exogenous corticoids and a prolactin inhibitor respectively.

Acta Endocrinol., 73, 385-399

Hoffmann, B., Höveler, R., Hasan, S. H., Failing, K. (1992)

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.

J. Reprod. Fert., 96, 837-845

Hohenhaus, M. U., Bostedt, H. (1990)

Zur Doppelovulation bei Stuten

Tierärztl. Praxis, 18, 155-163

Hopkins, S. M., Althouse, G. C. (2003)

Reproductive patterns of horses

In: Pineda, M. H., Dooley, M. P. (Hrsg.): McDonald's veterinary endocrinology and reproduction, 5. Auflage, Iowa State Press, Ames, 413-435

Hoppen, H. O. (1995)

Endocrine diagnostic techniques in equine reproduction

Reprod. Dom. Anim., 30, 149-152

Hornung, D., Dohrn, K., Sotlar, K., Greb, R. R., Wallwiener, D., Kiesel, L., Taylor, R. N. (2000)

Localization in tissues and secretion of eotaxin by cells from normal endometrium and endometriosis

J. Clin. Endocrinol. Metab., 85, 2604-2608

Huchzermeyer, S., Wehrend, A., König, A., Bostedt, H. (2002)

Qualitative and quantitative studies on the distribution of the bacterial flora in the genital tract of clinically normal mares

DVG-Proceedings der 35. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Leipzig (14.-15. Februar 2002), 121

Huchzermeyer, S. (2003)

Funktionelle und morphologische Studien über die equine Zervix im Stadium der Ingravidität

Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

Huchzermeyer, S., Wehrend, A., Bostedt, H. (2003)

Distribution of eosinophils and mast cells in the equine cervix

Reprod. Dom. Anim., 38 (4), 363

Huchzermeyer, S., Wehrend, A., Bostedt, H. (2005)

Histomorphology of the equine cervix

Anat. Histol. Embryol., 34 (1), 38-41

Imada, K., Ito, A., Sato, T., Namiki, M., Nagase, H., Mori, Y. (1997)

Hormonal regulation of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B gene expression in rabbit uterine cervical fibroblasts

Biol. Reprod., 56 (3), 575-80

Jain, N. C. (1993 a)

Kap. 14: The eosinophils

In: Jain, N. C. (Hrsg.): Essentials of veterinary hematology, 1. Auflage, Lea & Febiger, Philadelphia, 247-257

Jain, N. C. (1993 b)

Kap. 15: The basophils and mast cells

In: Jain, N. C. (Hrsg.): Essentials of veterinary hematology, 1. Auflage, Lea & Febiger, Philadelphia, 257-265

Jeffrey, J. J., Koob, T. J. (1980)

Endocrine control of collagen degradation in the uterus

In: Naftolin, F., Stubblefield, P. G. (Hrsg.): Dilatation of the uterine cervix, Raven Press, New York, 135-145

Jeziorska, M., Salamonsen, L. A., Woolley, D. E. (1995)

Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle

Biol. Reprod., 53 (2), 312-320

Jöchle, W. (1995)

Ovulationskontrolle bei der Stute mit OvuplantTM (Kurzzeit-Freisetzung des GnRH-Analogs Deslorelinazetat)

Tierärztl. Praxis, 23, 381-393

Jones, R. E., Duvall, D., Guilette, L. J. (1980)

Rat ovarian mast cells: distribution and cyclic changes

Anat. Rec., 197, 489-493

Jose, P. J., Griffiths-Johnson, D. A., Collins, P. D. (1994)

Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation

J. Exp. Med., 179, 881-887

Kaeoket, K., Persson, E., Dalin, A.-M. (2002)

Corrigendum to "The sow endometrium at different stages of the oestrus cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system."

Anim. Reprod. Sci., 73 (1-2), 89-107

Kähn, W., Leidl, W. (1987)

Echographische Befunde an Ovarien von Stuten

Tierärztl. Umschau, 42, 257-266

Kainer, R. A. (1992)

1. Reproductive organs of the mare

In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 3-19

Katayama, M. L., Federico, M. H., Brentani, R. R., Brentani, M. M. (1998)

Eosinophil administration in rat uterus following estradiol administration is modulated by laminin and its integrin receptors

Cell. Adhes. Commun., 5, 409-424

Kiviat, N. B., Paavonen, J., Brockway, J., Critchlow, C. W., Brunham, R. C., Stevens, C. E., Stamm, W. E., Kuo, C. C., DeRouen, T., Holmes, K. K. (1985)

Cytological manifestations of cervical and vaginal infections. I. Epithelial and inflammatory cellular changes

J. Am. Med. Assoc., 253, 989-996

Klein, C., Wehrend, A., Bostedt, H. (2004)

Puerperal involution of the ovine cervix and vagina is associated with tissue infiltration by eosinophilic granulocytes

Wiener Tierärztl. Monatsschr., 91 (Suppl. 2), 44

Klein, C., Huchzermeyer, S., Wehrend, A. (2006)

The function of the hymenal area and the cervix as microbiological barrier in the mare

Reprod. Dom. Anim., 41 (Suppl.1), 18

Kloss, S. (2004)

Histologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese des Prolapsus vaginae ante partum beim Schaf

Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

Knudsen, O. (1964)

Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares

Cornell. Vet., 54, 415-422

Knudsen, O. (1982)

A combined cytologic and bacteriologic endometrial examination in the mare

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 431-433

Knudsen, U. B. (1996)

Cervical ripening. A rat model for investigation of contractile and passive biomechanical properties, with focus on antigestagens, eosinophil granulocytes and mast cells

Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 75 (1), 88-89

Knudsen, U. B., Uldbjerg, N., Rechberger, T., Fredens, K. (1997)

Eosinophils in human cervical ripening

Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 72 (2), 165-168

Kraft, W., Dürr, U. M., Füll, M., Bostedt, H., Heinritzi, K. (2005)

10. Hämatologie

In: Kraft, W., Dürr, U. M. (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6.

Auflage, Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York, 49-86

Krishna, A., Terranova, P. F. (1985)

Alterations in mast cell degranulation and ovarian histamine in the prooestrus hamster

Biol. Reprod., 32, 1211-1217

Kuiper, H., Distl, O. (2004)

Intersexualität beim Hund: Ursachen und Genetik

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 111, 251-258

Kurosawa, R. (1931)

Über die Frühdiagnose der Trächtigkeit bei der Stute durch vaginale Untersuchung, insbesondere durch Untersuchung von Scheidenschleim

Tierärztl. Rundsch., 37, 345-349, 361-365

La Cour, A., Sprinkle, T. A. (1985)

Relationship of endometrial cytology and fertility in the broodmare

Equine Pract., 7, 28-36

Lack, P., Huchzermeyer, S. (2004)

Ovulationsinduktion bei der Stute

Tierärztl. Praxis, 32 (G), 357-361

Lauer, J. (1977)

Die klinische Zytodiagnostik zur Verifizierung symptomarmer Genitalinfektionen bei der Stute

Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

LeBlanc, M. (1992)

25. Vaginal Examination

In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 221-224

LeBlanc, M., Lopate, C., Knottenbelt, D., Pascoe, R. (2003)

Chapter 5: The mare

In: Knottenbelt, D. (Hrsg.): Equine Stud Farm Medicine and Surgery, Saunders, New York, 113-213

LeBlanc, M. M. (2003)

Persistent mating induced endometritis in the mare

In: Robinson, N. E. (Hrsg.): Current therapy on equine medicine, 5. Auflage, W.B. Saunders, Philadelphia, 234-237

Lee, Y. H., Howe, R. S., Sha, S.-J., Teuscher, C., Sheehan, D. M., Lyttle, R. (1989)

Estrogen regulation of an eosinophil chemotactic factor in the immature rat uterus

Endocrinology, 125, 3022-3028

Leiser, R. (1990)

14. Weibliche Geschlechtsorgane

In: Mosimann, W., Kohler, K. (Hrsg.): Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere, Paul Parey, Berlin und Hamburg, 232-248

Leiser, R. (1999)

Weibliche Geschlechtsorgane des Pferdes

In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 2, Eingeweide, 8. Auflage, Blackwell-Verlag, Berlin-Wien, 434-439

Leiva, M. C., Xu, Q., Galman, M., Lyttle, C. R. (1991)

Ontogeny of the production of an estrogen-regulated eosinophil chemotactic factor in the rat uterus

Biol. Reprod., 45, 818-823

Leppi, T. J., Kinnison, P. A. (1971)

The connective tissue ground substance in the mouse uterine cervix: An electron microscopic histochemical study

Anat. Rec., 170, 97-118

Lewis, G. S. (2003)

Role of ovarian progesterone and potential role of prostaglandin F2 α and prostaglandin E2 in modulating the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes

J. Anim. Sci., 81, 285-293

Liebich, H.-G. (2004)

14. Weibliche Geschlechtsorgane (Organa Genitalia Feminina)

In: Liebich, H.-G. (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York, 293-310

Lieux, P. (1970)

Relationship between the appearance of the cervix and the heat cycle in the mare
Vet. med. small animal clinician, 65, 878-886

Liggins, G. C. (1978)

Ripening of the cervix

Semin. Perinatol., 261-271

Liggins, G. C. (1981)

Cervical ripening as an inflammatory reaction

In: Ellwood, D. A., Anderson, A. B. (Hrsg.): The cervix in pregnancy and labour, Churchill Livingstone, Oxford, 1-13

Liu, I. K. M. (1988)

Uterine defense mechanisms in the mare

Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract., 4, 221-228

Luque, E. H., Montes, G. S. (1989)

Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes

Anat. Rec., 223, 257-265

Luque, E. H., Ramos, J. G., Rodriguez, H. A., Munoz de Toro, M. M. (1996)

Dissociation in the control of cervical eosinophilic infiltration and collagenolysis at the end of pregnancy or after pseudopregnancy in ovariectomized steroid-treated rats
Biol. Reprod., 55, 1206-1212

Luque, E. H., Munoz de Toro, M. M., Ramos, J. G., Rodriguez, H. A., Sherwood, O. D. (1998)

Role of relaxin and estrogen in the control of eosinophilic invasion and collagen remodeling in rat cervical tissue at term
Biol. Reprod., 59, 795-800

Lyttle, C. R., Medlock, K. L., Sheehan, D. M. (1984)

Eosinophils as the source of uterine nuclear type II estrogen binding sites
J. Biol. Chem., 259, 2697-2700

Lyttle, C. R., Teuscher, C., Medlock, K. L., Sheehan, D. M. (1989)

Estradiol-stimulated increase in uterine eosinophils and nuclear type II estrogen-binding sites are prevented by pertussis toxin
Endocrinology, 125 (5), 2773-2779

MacKenzie, J. R., Mattes, J., Dent, L. A., Foster, P. S. (2001)

Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4⁺ Th2 lymphocyte function
J. Immunol., 167, 3146-3155

Mahoney, P. M., Hurst, P. R., McLeod, B. J., McConnell, M. A., Thompson, E. G. (2003)

Effect of oestradiol treatment on mast cell populations and microflora in the vaginal cul-de-sac of seasonally anoestrous brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*)
Reproduction, 125, 733-741

Maier, T. (1940)

Untersuchungen über den Zyklus der Stute. III. Beitrag: Mikroskopisches
Scheidenbild

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

**Malschitzky, E., Rodriguez Trein, C., Cunha Bustamante Filho, I., Garbade, P.,
Gregory, R. M., Mattos, R. C. (2006)**

Young maiden mares can also be susceptible to a persistent mating-induced
endometritis

Pferdeheilk., 22 (2), 201-206

Markaverich, B. M., Roberts, R. R., Alejandro, M. A., Clark, J. H. (1986)

Uterine type II estrogen-binding sites are not of eosinophil origin

J. Biol. Chem., 261, 142-146

Matsuda, H., Okuda, K., Imori, T. (1983)

Tissue concentrations of eosinophilia in the bovine oviduct and uterus of different
stages of the oestrous cycle.

Res. Vet. Sci., 34 (3), 369-370

**Matthews, A. N., Friend, D. S., Zimmermann, N., Sarafi, M. N., Luster, A. D.,
Pearlman, E., Wert, S. E., Rothenberg, M. E. (1998)**

Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (11), 6273-6278

McDermott, M. R., Clark, D. A., Bienenstock, J. (1980)

Evidence for a common mucosal immunologic system: 2. Influence of the estrous
cycle on B-immunoblast migration into genital and intestinal tissues

J. Immunol., 124 (6), 2536-2539

Meinecke, B. (2000)

Reproduktion beim weiblichen Tier

In: Engelhardt, W. v., Breves, G. (Hrsg.): Physiologie der Haustiere, 1. Auflage,
Enke-Verlag, Stuttgart, 514-536

Meyer-Scheel, T. (2005)

Spezielle gynäkosonographische Befunde an Ovarien, Uterus und Cervix uteri und deren Beziehung zum Ovulationstermin bei der Warmblutstute

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

Michel, T., Hoppen, H. O., Bader, H., Engel, I. (1987)

Postluteolytische und periovulatorische Konzentrationen von Progesteron, Oestradiol und biologisch aktivem LH bei der Stute

Zuchthygiene, 22, 103

Munroe, C. D., Renton, J. P., Butcher, R. (1979)

The control of estrous behaviour in the mare

J. Reprod. Fert. Suppl., 27, 217-227

Murota, S., Abe, M., Otsuka, K. (1977)

Stimulatory effect of prostaglandins on the production of hexosamine-containing substances by cultured fibroblasts. (3) Induction of hyaluronic acid synthetase by Prostaglandin F 2 α

Prostagland., 14, 983-991

Mushayandebvu, T. I., Rajabi, R. (1995)

Relaxin stimulates interstitial collagenase activity in cultured uterine cervical cells from nonpregnant and pregnant but not immature guinea pigs; Estradiol-17 β restores relaxin's effect in immature cervical cells

Biol. Reprod., 53, 1030-1037

Nambo, Y., Nagaoka, K., Tanaka, Y., Nagamine, N., Shinbo, H., Nagata, S., Yoshihara, T., Watanabe, G., Groome, N. P., Taya, K. (2002)

Mechanisms responsible for increase in circulating inhibin levels at the time of ovulation in mares

Theriogenology, 57 (6), 1707-1717

Nett, T. M. (1992)

12. Reproductive peptide and protein hormones

In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 109-113

Nie, G. J., Barnes, A. J. (2003)

Use of prostglandin E1 to induce cervical relaxation in a maiden mare with post breeding endometritis

Equine Vet. Educ., 15 (4), 172-174

Nishikawa, Y., Hafez, E. S. E. (1962)

The reproduction of horses

In: Hafez, E. S. E. (Hrsg.): Reproduction in farm animals, Lea & Febiger, Philadelphia, 266-277

Ou, M.-C., Su, C.-S. (2000)

Implications of asymptomatic endocervical leukocytosis in infertility

Gynecol. Obstet. Invest., 49, 124-126

Packer, M., Patterson-Kane, J. C., Smith, K. C., Durham, A. E. (2005)

Quantification of immune cell populations in the lamina propria of equine jejunal biopsy specimens

J. Comp. Path., 132 (1), 90-95

Patel, M., Dorman, K. S., Zhang, Y. H., Huang, B. L., Arnod, A. P., Sinsheimer, J. S., Vilain, E., McCabe, E. R. (2001)

Primate DAX1, SRY, and SOX9: Evolutionary stratification of sex-determining pathway

Am. J. Hum. Genet., 68, 275-280

Peterson, F. B., McFeely, R. A., David, J. S. E. (1969)

Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 279-287

Pierson, R. A., Ginther, O. J. (1985)

Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare
Theriogenology, 24, 359-368

Pierson, R. A., Ginther, O. J. (1990)

Ovarian follicular response of mares to an equine pituitary extract after suppression of follicular development
Anim. Reprod. Sci., 22, 131-144

Platt, H., Atherton, J. G., Orskov, I. (1976)

Klebsiella and Enterobacter organisms isolated from horses
J. Hyg. Camb., 77, 41-44

Pohl, R., Wagenseil, F., Hünermund, G., Romer, H. (1977)

Die zytologische Untersuchung von Cervix-Tupferproben als diagnostisches Hilfsmittel bei der gynäkologischen Untersuchung und der zuchthygienischen Beurteilung von Stuten
Tierärztl. Umsch., 12, 634-640

Priedkalns, J., Leiser, R. (1999)

Female Reproductive System
In: Dellmann, H. D., Eurell, J. (Hrsg.): Textbook of Veterinary Histology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 247-269

Pudney, J., Quayle, A. J., Anderson, D. J. (2005)

Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone
Biol. Reprod., 73, 1253-1263

Pundel, J. P., Lichtfus, C. (1957)

Modifications in cytological staining of vaginal smears with Shorr hematoxylin
Gynaecologia, 144 (Suppl.), 58-60

Pycock, J. F. (1993)

Cervical function and uterine fluid accumulation in mares

Equine Vet. J., 25, 191

Rajabi, M. R., Dodge, G. R., Solomon, S., Poole, A. R. (1991)

Immunochemical and immunohistochemical evidence of estrogen-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation in the guinea pig at parturition

Endocrinology, 128 (1), 371-378

Ramos, J. G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., Munoz de Toro, M., Montes, G. S., Luque, E. H. (2000)

Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix

Steroids, 65 (7), 409-14

Re, G., Badino, P., Novelli, A., Di Renzo, G. F., Severino, L., De Liguoro, M., Ferone, M. R. (1995)

Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare

Res. Vet. Sci., 59, 214-218

Reibiger, I., Spaniel-Borowski, K. (2000)

Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary

J. Reprod. Fertil., 118, 243-249

Reinemund, B. (1988)

Vergleichende Untersuchungen zur Klinik, Zytologie, Bakteriologie und Histologie der Endometritis bei der Stute unter Berücksichtigung parenteraler und intrauteriner Behandlungsverfahren

Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen

Ricketts, S. W. (1982)

Endometrial Cytology

J. Reprod. Fertil. Suppl., 32, 638-639

Ricketts, S. W., Mackintosh, M. E. (1987)

Role of anaerobic bacteria in equine endometritis

J. Reprod. Fert. Suppl., 35, 343-351

Ricketts, S. W., Alonso, S. (1991)

The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease

Equine Vet. J., 23 (3), 189-192

Röber, C. (1914)

Anatomische und histologische Untersuchungen über die Cervix uteri von Equus caballus, Equus asinus und Ovis aries

Diss. med. vet., Universität Leipzig

Röber, O. (1910)

Vergleichende Untersuchungen über die elastischen Elemente in den weiblichen Geschlechtsorganen der Haussäugetiere

Diss. med. vet., Universität Leipzig

Rödiger, K., Bostedt, H. (2004)

Die Follikeldynamik und deren endokrine Steuerung bei der Stute im Verlauf des Östrus

Tierärztl. Praxis, 32 (G), 350-356

Romberg, G. H. (1954)

Endometrial aspiration smears in the study of infertility

Fertil. Steril., 5, 52

Romeis, B. (1989)

8. Färben der Schnitte

In: Böck, P. (Hrsg.): Mikroskopische Technik, 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg, Wien, 179-250

Rossdale, P. D., Ricketts, S. W. (1980)

1. Events leading to conception - The oestrous cycle

In: Rossdale, P. D., Ricketts, S. W. (Hrsg.): Equine stud farm medicine, 2. Auflage, Lea & Febiger, Philadelphia, 11-42

Roszel, J.-F., Freeman, K.-P. (1988)

Equine endometrial cytology

Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 4 (2), 247-262

Rötting, A. K., Freeman, D. E., Constable, P., Eurell, J., Wallig, M. (2006)

Untersuchungen zur Beteiligung lokaler eosinophiler Granulozyten an Darmerkrankungen des Pferdes

19. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten, Hannover, in Press

Saltiel, A., Gutierrez, A., de Buen-Llado, N., Sosa, C. (1987)

Cervico-endometrial cytology and physiological aspects of the post-partum mare
J. Reprod. Fertil. Suppl., 35, 305-309

Sato, S., Suzuki, T. (1927)

Beziehungen zwischen Brunstzyklus und Scheidenschleimabstrich

Z. Japan. Tierzucht, 2, 4

Sato, T., Ito, A., Mori, Y., Yamashita, K., Hayakawa, T., Nagase, H. (1991)

Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts - Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol

Biochem. J., 275, 645-650

Schaetz, F. (1982)

Krankheiten und Fortpflanzungsstörungen der weiblichen Geschlechtsorgane

In: Dietz, O., Wiesner, E. (Hrsg.): Handbuch der Pferdekrankheiten für Wissenschaft und Praxis, Bd. II, Gustav Fischer Verlag, Jena, 709-732

Schatalow, P. (1933)

Zur Frage des Geschlechtszyklus der Pferde und Kühe nach dem mikroskopischen Bilde des Vaginalausstriches
Berl. Tierärztl. Wschr., 49, 81-84

Scheibl, P., Zerbe, H. (2000)

Einfluss von Progesteron auf das Immunsystem mit Berücksichtigung der bovinen Retentio secundinarum
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 107, 221-227

Schmalz (1911)

Die weiblichen Geschlechtsorgane
In: Ellenberger (Hrsg.): Ellenbergers Handbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere, Bd. 2, 233-239

Schmidt, A. R. (1988)

Guarded right uterine horn lavage in the mare for bacteriology and cytology
Diss. med. vet., Michigan State University

Schnorr, B., Kressin, M. (2001)

25. Entwicklung der Geschlechtsorgane
In: Schnorr, B., Kressin, M. (Hrsg.): Embryologie der Haustiere, 4. Auflage, Enke-Verlag, Stuttgart, 180-198

Schnurrbusch, U., Vogler, B. (2002)

Sexualzyklus - Pferd
In: Schnurrbusch, U., Vogler, B. (Hrsg.): Gynäkologie für Veterinärmediziner; Teil 1, Verlag wissenschaftliche Scripten, Zwickau, 54-60

Schubert, A. K. (1998)

Effects of progesterone antagonists on the eosinophilic granulocytes in the rat uterus
Ann. Anat., 180 (5), 401-408

Schuh, R. (1993)

Histomorphometrische Untersuchungen an der Cervix uteri bei Katze, Hund, Schaf, Rind und Pferd

Diss. med. vet., Ludwig-Maximilian-Universität München

Selbitz, H.-J. (2002)

5. Bakterielle Krankheiten der Tiere

In: Rolle, M., Mayr, A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. völlig neubearbeitete Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 417-588

Sertrich, P. L. (1992)

46. Cervical problems in the mare

In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 404-407

Sherwood, O. D. (1994)

The physiology of reproduction

In: Knobil, E., Neill, J. D. (Hrsg.): The physiology of reproduction, Volume I, 2. Auflage, Raven Press Ltd, New York, 861-1009

Shideler, R. K. (1992)

23. Rectal palpation

In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 204-211

Shin, S. J., Lein, D. H., Aronson, A. L., Nusbaum, S. R. (1979)

The bacteriological culture of equine uterine contents: In-vitro sensitivity of organisms isolated and interpretation

J. Reprod. Fert. Suppl., 27, 307-315

Sisson, S. (1975)

Equine urogenital system

In: Getty, R. (Hrsg.): Sisson and Grossman's The Anatomy of the domestic Animals, W. B. Saunders, Philadelphia, 542-549

Slusher, S. H., Freeman, K.-P., Roszel, J.-F. (1984)

Eosinophils in equine uterine cytology and histology specimens

J. Am. Vet. Med. Assoc., 184 (6), 665-670

Smollich, A. (1992)

8.2 Weibliches Geschlechtssystem

In: Smollich, A., Michel, G. (Hrsg.): Mikroskopische Anatomie der Haustiere, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 281-335

Solomon, W. J., Schultz, R. H., Fahning, M. L. (1972)

A study of chronic infertility in the mare utilizing uterine biopsy, cytology and cultural methods

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 55-68

Spanggaard, H., Knudsen, U. B., Uldbjerg, N., Jeziorska, M., Woolley, D. E., Danielsen, C. C. (1997)

Mast cells in cervical ripening - an immunohistochemical and biomechanical study in rats

Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 73 (1), 91-97

Squires, E. L., Picket, B. W., Shideler, R. K., Voss, J. L. (1981)

Detection of ovulation and pregnancy using electrical conductivity and ultrasound

Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 199-209

Stiemer, B. (1988)

Untersuchung der Bedeutung des Progesterons für die mechanischen Eigenschaften der Cervix uteri in der Spätgravidität bei der Ratte

Diss. med. vet., FU Berlin

Sullivan, D. A., Wira, C. R. (1983)

Hormonal regulation of immunoglobulins in the rat uterus: uterine response to a single estradiol treatment

Endocrinology, 112, 260-268

Sullivan, D. A., Wira, C. R. (1984)

Hormonal regulation of immunoglobulins in the rat uterus: uterine response to a multiple estradiol treatment
Endocrinology, 114, 650-658

Sweet, R. L. (1998)

The enigmatic cervix
Dermatol. Clin., 16 (4), 739-745

Tchernitchin, A., Roorijck, J., Tchernitchin, X., Vandenhende, J., Galand, F. (1974)

Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration
Nature, Lond., 248, 142-143

Tchernitchin, A., Tchernitchin, X., Galand, P. (1975)

Correlation of estrogen-induced uterine eosinophilia with other parameters of estrogen stimulation, produced with estradiol-17 β and estriol
Experientia, 31 (8), 993-994

Tchernitchin, A., Barrera, J., Arroyo, P., Mena, M. A., Vilches, K., Grunert, G. (1985)

Degranulatory action of estradiol on blood eosinophil leukocytes in vivo and in vitro
Agents Actions, 17, 60-66

Terada, N., Yamane, T., Matsumoto, K., Asai, H., Kitamura, Y. (1985)

Estrogen-induced increase in eosinophil number and peroxidase activity in uterus of genetically mast cell-deficient W/W^v mice
Biol. Reprod., 33 (4), 899-901

Tillmann, H., Meinecke, B. (1980)

Die zytodiagnostische Interpretation der lokalen Abwehrreaktionen bei Genitalinfektionen der Stute
Tierärztl. Praxis, 8, 211-222

Townson, D. H., Ginther, O. J. (1989)

Ultrasonic characterization of follicular evacuation during ovulation and fate of the discharged follicular fluid in mares

Anim. Reprod. Sci., 20, 131-141

Volkmann, D. H., Bertschinger, H. J., Schulmann, M. L. (1995)

The effect of prostaglandin E₂ in the cervixes of dioestrus and prepartum mares

Reprod. Dom. Anim., 30, 240-244

Waelchli, R. O., Corboz, L., Winder, N. C. (1988)

Comparison of histological, cytological and bacteriological findings in the endometrium of the mare

J. Vet. Med. A., 35, 442-449

Waelchli, R. O., Känzig, M., Gygax, A., Corboz, L., Rüsch, P. (1993)

The relationship between cycle stage and results of uterine culture in the mare

J. Vet. Med. A., 40, 569-575

Wagner, H. (1934)

Mikroskopische Brunstschleimuntersuchungen bei einer Stute unter besonderer Berücksichtigung des Leukozytenbefundes

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 42, 134-136

Wah, R. M., Anderson, D. J., Hill, J. A. (1999)

Asymptomatic cervicovaginal leukocytosis in infertile women

Fertil. Steril., 54 (3), 445-450

Wallis, R. M., Hillier, K. (1981)

Regulation of collagen dissolution in the human cervix by oestradiol-17 β and progesterone

J. Reprod. Fert., 62, 55-61

Walsh, G. M., Sexton, D. W., Blaylock, M. G. (2003)

Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation corticosteroids, eosinophils and bronchial epithelial cells: new insights into the resolution of inflammation in asthma

J. Endocrinol., 178, 37-43

Walter, J., Klein, C., Wehrend, A. (2006)

Usability of the Eosin-Thiazin staining method in exfoliative endometrial cytology of mares

Reprod. Dom. Anim., 41 (Suppl.1), 39

Wehrend, A., Thumes, M. (2000)

Pyometra bei einer Stute als Differentialdiagnose zur Gravidität

Tierärztl. Praxis, 28 (G), 345-346, 355-356

Wehrend, A., Herfen, K., Litzke, L.-F., Bostedt, H. (2001)

Hysterektomie bei einer Jungstute mit einer Zervix duplex und rezidivierender Endometritis

Pferdeheilk., 17 (2), 141-144

Wehrend, A. (2003)

Untersuchungen zur Involution der Vagina und Zervix beim Rind post partum unter Berücksichtigung der Zervix als Geburtshindernis

Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Gießen

Wehrend, A., Trasch, K., Failing, K., Bostedt, H. (2003)

Untersuchungen zum regionalen pH-Wert in Vagina, Zervix und Uterus von Kühen im Interöstrus

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 110 (2), 65-8

Wehrend, A., Gümbel, B., Leiser, R., Failing, K., Bostedt, H. (2004a)

Vaginal and cervical dilatation intrapartum is associated with eosinophilic infiltration in the cow but not in the sheep

Reprod. Dom. Anim., 39, 1-5

Wehrend, A., Hetzel, U., Huchzermeyer, S., Klein, C., Bostedt, H. (2004b)

Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue

Anat. Histol. Embryol., 33, 180-182

Wehrend, A., Huchzermeyer, S., Reinemund, B. (2004c)

Investigations on the suitability of intracervical and intrauterine sampling for bacteriological investigations and cytological assessment in mares

Wiener Tierärztl. Monatsschr., 91 (Suppl. 2), 72

Wehrend, A., Huchzermeyer, S., Bostedt, H. (2005)

Distribution of eosinophils and mast cells in the cervical tissue of non-gravid mares during dioestrus

Reprod. Dom. Anim., 40, 562-563

Weitkamp, K. (1990)

Untersuchungen zur Prädiktion des Ovulationszeitpunktes bei der Stute

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

Welle, M. M., Audige, L., Belz, J.-P. (1997)

The equine endometrial mast cell during the puerperal period: Evaluation of mast cell numbers and types in comparison to other inflammatory changes

Vet. Pathol., 34 (1), 23-29

Widders, P. R., Stokes, C. R., David, J. S. E., Bourne, F. J. (1985)

Immunohistological studies of the local immune system in the reproductive tract of the mare

Res. Vet. Sci., 38, 88-95

Wilhelm, M., King, B., Silverman, A. J., Silver, R. (2000)

Gonadal steroids regulate the number and activational state of mast cells in the medial habenula

Endocrinology, 141 (3), 1178-86

Will, K., Kähn, W., Leidl, W. (1988)

Sonographische Untersuchungen über die präovulatorische Follikelentwicklung bei der Stute

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 95, 353-408

Wingfield Digby, N. J. (1978)

The technique and clinical application of endometrial cytology in mares

Equine Vet. J., 10 (3), 167-170

Wingfield Digby, N. J., Ricketts, S. W. (1982)

Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981

J. Reprod. Fert. Suppl., 32, 181-185

Wiqvist, I., Norström, A., Wiqvist, N. (1984)

Effects of oxytocin on cervical and uterine connective tissue

Acta Endocrinologica, 106, 271-176

Wiqvist, I., Norström, A., Wiqvist, N. (1985)

Oxytocin and cervical connective tissue

J. Steroid Biochem., 12, 451-459

Wira, C. R., Sullivan, D. A. (1985)

Estradiol and progesterone regulation of Immunoglobulin A and G and secretory component in cervicovaginal secretions of the rat

Biol. Reprod., 32, 90-95

Wira, C. R., Prabhala, R. H. (1990)

The reproductive tract is an inductive site for immune responses: effect of oestradiol and antigen on antibody and secretory component levels in uterine and cervico-vaginal secretions following various routes of immunization

Conference: Local immunity in reproductive tract tissues, New Delhi, India, 271-293

Witherspoon, D. M., Goldston, R. T., Adsit, M. E. (1972)

Uterine culture and biopsy in the mare

J. Am. Vet. Med. Assoc., 161, 1365

Wrobel, K.-H. (1971)

Histologische, histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Zervix uteri des Rindes

Habilitationsschrift, Beiheft zum Zbl. Vet. Med., 15 (Verlag Paul Parey), Berlin und Hamburg

Wulster-Radcliffe, M. C., Seals, R. C., Lewis, G. S. (2003)

Progesterone increases susceptibility of gilts to uterine infections after intrauterine inoculation with infectious bacteria

J. Anim. Sci., 81, 1242-1252

Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E., Lyttle, C. R. (1992)

Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin

J. Biol. Chem., 267, 11968-11971

Yin, Y., Ma, L. (2005)

Development of the mammalian female reproductive tract

J. Biochem., 137, 677-683

Zarrow, M. X., Yochim, J. (1961)

Dilatation of the uterine cervix of the rat and accompanying changes during the estrous cycle, pregnancy and following treatment with estradiol, progesteron and relaxin

Endocrinology, 69, 292-304

Zhang, J., Nie, G., Wang, J., Wooley, D., Salamonsen, L. (1998)

Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation

Biol. Reprod., 59, 693-703

**Zhao, X. J., McKerr, G., Dong, Z., Higgins, C. A., Carson, J., Yang, Z. Q.,
Hannigan, B. M. (2001)**

Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not
lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways

Thorax, 56, 205-211

Danksagungen

Mein Dank gilt Prof. Dr. A. Wehrend für die Überlassung des Themas und für seine unermüdliche Motivation bei der Betreuung dieser Arbeit. Neben der Hilfe in wissenschaftlichen Fragen sei Ihm auch für die klinische Ausbildung gedankt.

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. Bostedt danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Klinik anzufertigen sowie für die stete Förderung meiner Fähigkeiten auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin.

Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann und seinen Mitarbeitern im RIA-Labor sei für die Hormonanalysen gedankt.

Herrn Dr. M. Hollenhorst (Hochschulrechenzentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen) danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen sei für die Kooperation bei der Einbettung der Gewebeproben gedankt.

Bei Herrn Harald Simon und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die Hilfe bei der Probengewinnung am Schlachthof.

Für die vielfältige Unterstützung bei den Arbeiten im Labor bin ich den Labordamen, allen voran Julia Blad-Stahl, sehr dankbar.

Mein herzlicher Dank gilt Stephan Groeger für seine Hilfe in allen Phasen der Arbeit, insbesondere für das ständige Korrekturlesen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäss aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5045-2



9 783835 950450